
Die Verteilung transkribierender RNA-Polymerase I auf ribosomaler DNA

Mathias Orban



München 2013

Aus dem Institut für Klinische Molekularbiologie und Tumorgenetik

Abteilung für Molekulare Epigenetik

Institut des Helmholtz-Zentrum München,

Leiter: Prof. Dr. rer. nat. Dirk Eick

Die Verteilung transkribierender RNA-Polymerase I auf ribosomaler DNA

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Mathias Orban

aus

Dessau

2013

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Gustav Klobeck
Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Ursula Zimmer-Strobl
Priv. Doz. Dr. Dejana Mokranjac
Prof. Dr. Joachim-Ulrich Walther

Mitbetreuung durch die
promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. rer. nat. Dirk Eick
Prof. Dr. med. Michael Hölzel

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 11.07.2013

Meiner lieben Familie

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	6
1.1 Zellwachstum in eukaryoten Zellen	6
1.1.1 Hintergrund.....	6
1.1.2 Das Ribosom	7
1.1.3 Ribosomenbiogenese und Zellwachstum	7
1.2 Ribosomenbiogenese	8
1.2.1 Der Nukleolus als Ort der Ribosomenbiogenese	9
1.2.2 Modifikation ribosomaler RNA	10
1.2.3 p53 und nukleolärer Stress.....	11
1.2.4 Ribosomenbiogenese und genetische Krankheiten	12
1.2.5 Ribosomenbiogenese und Krebs.....	15
1.3 Transkription der rDNA durch RNA-Polymerase I	20
1.3.1 Aufbau der rDNA	20
1.3.2 RNA-Polymerase I Struktur und Funktion	21
1.3.3 Epigenetische Kontrolle der rDNA-Transkription	22
1.3.4 Kinetik und Kontrolle der RNA-Polymerase I	23
1.3.5 Verteilung transkribierender RNA-Polymerasen auf Genen.....	25
1.4 Fragestellung	27
2 Material und Methoden	28
2.1 Material..	28
2.1.1 Chemikalien	28
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	28
2.1.3 Geräte.....	29
2.1.4 Puffer und Lösungen	30
2.1.5 Sequenz der DNA-Oligonukleotide	32
2.1.6 Sequenz und Annotation des synthetischen DNA-Abschnitts für die Herstellung eines <i>in vitro</i> Transkriptionssystems	33
2.1.6 Software	35
2.2 Methoden	35
2.2.1 Kultivierung humaner Zellen	35
2.2.2 Lebendzellzahlbestimmung.....	36
2.2.3 Kryokonservierung humaner Zelllinien	36
2.2.4 Restriktionsverdau mit Endonuklease EcoRV	36
2.2.5 DNA- und RNA-Gelelektrophorese.....	36

2.2.6 RNA-Geltrocknung	37
2.2.7 Detektion radioaktiv markierter RNA mittels Autoradiographie	37
2.2.8 Immobilisierung von DNA-Oligonukleotiden auf nukleinsäurebindenden Nylonmembranen.....	37
2.2.9 Herstellung eines <i>in vitro</i> Transkriptionssystems und T7-RNA- Polymerasereaktion	38
2.2.10 Nukleärer Run-on	39
2.2.11 Globale Run-on Sequenzierung (GRO-seq).....	39
3 Ergebnisse	41
3.1 Nukleärer Run-on als Methode zur Bestimmung der RNA-Polymerase- Konzentration.....	41
3.2 Herstellung eines <i>in vitro</i> Transkriptionssystems zur Normalisierung der Hybridisierungsstärke von DNA-Oligonukleotiden mit variablem GC-Gehalt ...	44
3.3 Entwicklung eines Algorithmus zur Normalisierung der Hybridisierungsstärken von DNA-Oligonukleotiden mit variablem GC-Gehalt .	47
3.4 Nukleärer Run-on der rDNA in humanen Zellen.....	48
3.5 Vergleich der Ergebnisse aus nukleärem Run-on und globaler Run-on Sequenzierung (GRO-seq).....	53
3.6 Transkribierende RNA-Polymerase I konzentriert sich an rDNA-Sequenzen die ko- und posttranskriptioneller Modifikation unterliegen.....	57
4 Diskussion	62
4.1 Interpretation der Ergebnisse	62
4.2 Methodendiskussion	64
4.2.1 <i>In vitro</i> Transkriptionssystem	64
4.2.2 Algorithmus zur Normalisierung der Hybridisierungsstärken von DNA- Oligonukleotiden.....	65
4.2.3 Nukleärer Run-on und globale Run-on Sequenzierung (GRO-seq)	66
4.2.4 GC-abhängige Limitationen neuer Sequenzierungstechnologien	67
4.3 Literaturvergleich.....	69
4.3.1 Verteilung der RNA-Polymerase I und assoziierter Proteine auf rDNA ...	69
4.3.2 Kotranskriptionelle Prozessierung und Basenmodifikation der rRNA	70
4.4 Schlussfolgerung.....	72
5 Zusammenfassung	74
6 Literaturverzeichnis	76
7 Danksagung	87
8 Eidesstattliche Versicherung	88

1 Einleitung

1.1 Zellwachstum in eukaryoten Zellen

1.1.1 Hintergrund

Die Größe von Lebewesen auf der Erde zeigt eine enorme Bandbreite. Mit einem Volumen von 1500 m³ ist der Riesenmammutbaum *Sequoiadendron giganteum* eine Trilliarde (10²¹) mal größer als das 7,2 µm³ kleine *Nanoarchaeum equitans*, ein thermophiler Einzeller [1],[2]. Körper- und Organgrößen können trotz ähnlicher Zellgröße zwischen verschiedenen Organismen stark variieren. Die Herzmuskelzellen des Menschen und des Blauwals sind ähnlich groß, das Blauwalherz ist jedoch zweitausend mal schwerer als das des Menschen. Innerhalb eines Organismus unterscheiden sich Zellen stark in ihrer Größe. Die mit dem unbewaffneten Auge erkennbare menschliche Eizelle (100 µm Durchmesser) ist hinsichtlich ihres Volumens sechzehntausendfach größer als die Körnerzelle der Kleinhirnrinde (4 µm Durchmesser). Diese Größen- und Massenunterschiede beruhen auf einer differenzierten Regulation des Zellwachstums [3].

Der Begriff Zellwachstum wird oft für die Proliferation von Zellen, also für die numerische Vermehrung, verwendet. Dies ist jedoch irreführend, da Zellwachstum an sich die Zunahme von Zellvolumen und -masse beschreibt, Zellproliferation hingegen die Zunahme der Zellzahl durch Zellteilung [4],[5]. Die Zellgröße wird demnach durch das Zusammenspiel von Zellwachstum und Zellteilung bestimmt. Proliferierende, also sich teilende, Zellen müssen neben der Verdopplung ihres genetischen Materials genügend Zellbestandteile vor Eintritt in die Mitose produzieren, um funktionsfähige Tochterzellen zu generieren [6]. Besonders eindrucksvoll ist dies bei der Oo- und Embryogenese zu beobachten. Die Oozyte nimmt bis zu ihrer Reifung stark an Größe zu, um dann nach der Befruchtung die Embryogenese zu initiieren. Dabei werden die Tochterzellen von Teilung zu Teilung zunächst kleiner. Auch Krebszellen müssen sicherstellen, dass ihre Zellgröße mit der Zellteilung Schritt hält, da die Tumormasse ansonsten nicht an Größe zunehmen würde. Wie die Zelle die richtige Zellgröße für eine erfolgreiche Zellteilung erkennt, ist Ziel intensiver Forschung [7],[8].

Den größten Anteil der Trockenmasse einer Zelle stellen Proteine. Daher müssen für das Zellwachstum neu generierte Proteine bereitgestellt werden. Diese können nur durch eine Erhöhung der translationalen Kapazität in ausreichender Menge produziert werden. Da Ribosomen der Ort der Proteinsynthese sind, wird zuerst die Herstellung von Ribosomen selbst erhöht [9]. Dies wird insbesondere über die Steigerung der Synthese ribosomaler RNA reguliert [10]. In Hefezellen wird bis zu 75% aller Transkriptionsaktivität für die Herstellung von Ribosomen aufgewendet, davon ca. 60% für die ribosomale RNA und ca. 15% für die

Transkription der mRNA ribosomaler Proteine [11]. In proliferierenden Säugerzellen wird der ribosomale Anteil der Transkriptionsaktivität auf 35% geschätzt. Folglich sind die Hauptprodukte der Ribosomen die ribosomalen Proteine [12].

1.1.2 Das Ribosom

Ribosomen sind klassische Ribonukleoproteinpartikel. Sie bestehen zu ca. 2/3 aus ribosomaler RNA und zu ca. 1/3 aus ribosomalen Proteinen, die sich auf zwei Untereinheiten verteilen. Man unterscheidet eine kleine Untereinheit, auch 40S genannt, von einer großen Untereinheit, 60S genannt. Im weiteren Verlauf werden diese als SSU (small subunit 40S) und LSU (large subunit 60S) bezeichnet, die dazugehörigen Proteine als RPS und RPL (ribosomal protein small/large). In Säugerzellen besteht die LSU aus ca. 49 RPL und drei verschiedenen rRNA-Spezies (5S, 5.8S, 28S rRNA), die SSU aus ca. 33 RPS und einer rRNA Spezies (18S) [13],[14]. Die ribosomale RNA erfüllt katalytische und strukturelle Funktionen. Die ribosomalen Proteine sind primär Teil der Struktur, verantworten aber auch den nukleären Export des Ribosoms bis hin zu Signalfunktionen innerhalb der Zelle [15].

1.1.3 Ribosomenbiogenese und Zellwachstum

Das Wachstum einer Zelle wird durch Signalwege reguliert, die wiederum durch externe Stimuli aktiviert werden. Viele dieser Signalwege erzielen ihre Wirkung über eine Steigerung der Ribosomenbiogenese. Exemplarisch sei der Insulin-like-growth-factor-1 (IGF1)-Signalweg genannt. Nach Aktivierung des membranständigen IGF-Rezeptors durch IGF1 wird das intrazelluläre Signalmolekül Insulinrezeptorsubstrat 1 (IRS-1) in den Nukleus transloziert, bindet dort den *upstream binding factor 1* (UBF1), einen entscheidenden Faktor für rRNA-Transkription, und vermittelt die UBF1-Aktivierung durch die Phosphatidylinositol-3-Kinase [16]. Über diesen Signalweg wird in Drosophilafliegen und Mausembryonen ca. 50% der Zell- und Körpergröße bestimmt [17]. Durch den IGF1-Signalweg wird zudem die p70S6-Kinase aktiviert. Diese Kinase phosphoryliert RPS6 in der SSU, wodurch die Translation der mRNA ribosomaler Proteine am phosphorylierten Ribosom selektiv gesteigert wird [18]. Interessanterweise besitzen p70S6-Kinase-defiziente Drosophilafliegen die gleiche Zellzahl wie Wildtypfliegen, ihre Zellgröße ist aber kleiner und ihre Organentwicklung verzögert [19]. Im Gegensatz dazu zeigen Drosophilafliegen mit Mutationen in anderen ribosomalen Strukturproteinen, sogenannte „Minute“-Mutanten, verlangsamtes Wachstum bei normaler Zellgröße [20]. Ein vergleichbarer Effekt konnte in Mäusen durch die isolierte Deletion von RPS6 gezeigt werden [21]. Durch den Ausfall der Produktion eines einzelnen ribosomalen Proteins sinkt die Rate der Ribosomenbiogenese unter Wachstumsbedingungen. Dabei ist die Untereinheit betroffen, deren Bestandteil das ribosomale Protein ist. Die Anzahl

bestehender Ribosomen, vor allem in Polysomen, ist über einen bestimmten Zeitraum gemäß ihrer Halbwertszeit konstant. Die Translation anderer ribosomaler Proteine wird während dieses Zeitraums nicht verändert. In einem Leberregenerationsmodell konnte gezeigt werden, dass nach partieller Hepatektomie in RPS6-depletierten Mauseellen die Leber nicht zur ursprünglichen Größe regeneriert. Histologische Schnitte und Zellzyklusanalysen zeigen fehlende Mitosen und einen Zellzyklusstopp in G1. Der Eintritt in die S-Phase wird durch das Fehlen der Zellzyklusproteine Cyclin E, Cyclin A und CDK2 verhindert. Somit wird durch eine Störung der Ribosomenbiogenese verhindert, dass die Zellen trotz der vorhandenen translationalen Kapazität bestehender Polysomen und ausreichender Zellgröße proliferieren.

Im Gegensatz dazu reguliert die p70S6-Kinase wahrscheinlich einen zellulären Kontrollpunkt, der die Zellgröße für eine korrekte Teilung registriert. Durch den Ausfall der p70S6-Kinase könnte die Translation aller ribosomaler Proteine so weit reduziert werden, dass die Ribosomenbiogenese und damit das Zellwachstum sistiert, die Translation nicht-ribosomaler Protein-mRNA (wie z.B. zellzyklusregulierte mRNAs) an bestehenden Ribosomen aber verstärkt wird und damit Zellteilung vor Erreichen einer physiologischen Zellgröße ablaufen kann [22]. Damit wäre die Reduktion der Zellgröße bei normaler oder erhöhter Zellzahl erklärt.

Zudem bestimmt die Rate der Ribosomenbiogenese selbst, ob eine Zelle in die S-Phase eintritt [9],[5],[23]. Andere wichtige Determinanten für die Zunahme der Zellmasse sind der Proteinumsatz in einer Zelle und das Nährstoffangebot, das über den mTOR-Signalweg vermittelt wird. Der mTOR Signalweg wiederum stellt einen wichtigen Regulationsmechanismus für die Ribosomenbiogenese dar.

1.2 Ribosomenbiogenese

Der Begriff Ribosomenbiogenese beschreibt den Prozess der Herstellung von Ribosomen. Ribosomale Strukturproteine und ribosomale RNA müssen produziert werden, die einzelnen Komponenten prozessiert, modifiziert, in bestimmte Zellkompartimente transportiert, zu den Untereinheiten zusammengesetzt und schließlich ins Zytoplasma exportiert werden. Diese Teilprozesse laufen koordiniert ab und werden von Hunderten von Proteinen reguliert [24].

1.2.1 Der Nukleolus als Ort der Ribosomenbiogenese

Der Nukleolus ist eine Zellorganelle, die sich während der G1-Phase des Zellzyklus konstituiert und Ort der Ribosomenbiogenese ist. Der Nukleolus formiert sich um die ca. 400 Kopien von rDNA, welche in Clustern angeordnet sind. Diese rDNA-Cluster bilden die sogenannten nukleolären Organisationsregionen (NOR), die sich auf den akrozentrischen Chromosomen (Chromosom 13,14,15,21,22) befinden.

Wachstumsstimulierte Säugerzellen zeigen als Ausdruck erhöhter Ribosomenbiogenese eine Hypertrophie des Nukleolus [25]. Neben der prominenten Bedeutung für die Ribosomenbiogenese sind auch Funktionen des Nukleolus für virale Infektionen, Zellalterung, Zellzykluskontrolle, RNA-Metabolismus, RNA-Interferenz und Telomerasereifung beschrieben worden [26-30].

Der Nukleolus ist aufgrund seines hohen Protein- und RNA-Gehaltes in der Lichtmikroskopie deutlich zu erkennen. In der Hämatoxylin/Eosinfärbung färbt er sich eosinophil aufgrund des hohen Proteingehaltes. In der elektronenmikroskopischen Darstellung kann man drei Regionen unterscheiden: Die granuläre Komponente (GC) umgibt eine dichte fibrilläre Komponente (DFC), die sich wiederum den fibrillären Zentren (FC) als Rand anlegt. Letztere ist weniger elektronendicht als die anderen beiden Komponenten. Am Übergang von DFC zu FC befindet sich aktiv transkribierte rDNA. Vor allem in den FC wird dann die rRNA von snoRNPs prozessiert und modifiziert. In der GC wird die Zusammensetzung der Untereinheit abgeschlossen [31].

Insgesamt finden sich im Nukleolus über 700 verschiedene Proteine [32], die weitestgehend in Eukaryoten konserviert sind. Ca. 30% dieser identifizierten Proteine erfüllen Aufgaben während der Ribosomenbiogenese. Darüber hinaus gibt es eine große Gruppe von Proteinen wie Transkriptionsfaktoren, chromatinmodifizierende Proteine, RNA-modifizierende Enzyme und Splicing-Faktoren, die für die RNA-Polymerase II abhängige Transkription zuständig sind. Proteine für DNA-Reparatur und Zellzykluskontrolle sind auch im Nukleolus zu finden [33]. Dabei unterliegen diese Proteine einer starken örtlichen Dynamik. So nimmt die nukleoläre Präsenz von beispielsweise *SSU processome* Proteinen im Gegensatz zu anderen snoRNP-Bestandteilen nach Actinomycin-D-Inhibition der RNA-Polymerase I (Pol I) Transkription stark ab.

Der Nukleolus verändert seine Struktur zellzyklusabhängig. Während der Zellteilung löst sich der Nukleolus als licht- und elektronenmikroskopisch abgrenzbare Struktur auf. Die Desintegration des Nukleolus mit Beginn der Mitose geht mit dem Verlust von Pol I-Untereinheiten in den NORs einher. In der Prophase der Mitose verbleiben einige Faktoren der Pol I-Transkriptionsmaschine wie UBF1 an den NORs. Die meisten Prozessierungsfaktoren der Ribosomenbiogenese dissoziieren nach Sistieren der Transkription ins Nukleoplasma, respektive ins Zytoplasma nach Auflösung der

Kernmembran [34]. Dort binden sie entweder an Chromosomen oder sammeln sich nach der Zytokinese teilweise in Subkomplexen wie den *nucleolar derived foci* (NDFs) oder *pre-nucleolar bodies* (PNBs). Aus diesen werden dann rDNA-bindende Faktoren zur Neubildung des Nukleolus rekrutiert. Die NORs vereinen sich schließlich und bilden den Interphase-Nukleolus [35, 36].

1.2.2 Modifikation ribosomaler RNA

Die menschliche rRNA wird an ca. 115 Basen methyliert und an 95 Uridinbasen pseudouridinyliert [37-39]. Im Gegensatz zur unmodifizierten rRNA-Sequenz, die zu den evolutionsgenetisch konserviertesten RNAs gehört [40], unterscheiden sich die modifizierten rRNAs der einzelnen Spezies erheblich. Höhere Organismen besitzen mehr als viermal so viele Pseudouridine wie Bakterien [41].

Bei der Generierung der Modifikationen spielen hunderte kleine nukleoläre RNAs (*small nucleolar* RNAs, snoRNAs) eine Rolle [42, 43]. SnoRNAs bilden mit mehreren Proteinen funktionelle Pseudouridinsynthetasen und Methyltransferasen und dienen diesen Enzymen als sequenzspezifische Leit-RNA, die teilweise komplementär zur Ziel-rRNA-Sequenz ist [44]. Die Pseudouridinylierungen werden von sogenannten H/ACA snoRNAs durchgeführt [45, 46], die Methylierungen an der 2'-O-Ribose von C/D Box snoRNAs [47-50]. Mit hoher Wahrscheinlichkeit werden viele Modifikationen schon kotranskriptionell eingefügt [51]. Die Funktion der einzelnen Modifikationen ist noch nicht befriedigend geklärt. Die Modifikationen konzentrieren sich vor allem in den später für die Ribosomenfunktion wichtigen katalytischen Sequenzabschnitten wie dem Peptidyltransferasezentrum und dem Dekodierungszentrum [52, 53]. Das Dekodierungszentrum innerhalb des Ribosoms sorgt für eine korrekte Codon-Anticodon Interaktion zwischen mRNA und tRNA. Daten aus Hefezellen lassen vermuten, dass einzelne Mutationen von Modifikationspositionen im Peptidyltransferasezentrum oder dem Dekodierungszentrum, keinen großen Einfluss auf die Funktion der Ribosomen haben [54, 55]. Bei Deletion mehrerer örtlich zusammenhängender Modifikationen zeigen sich jedoch vermehrt defekte Untereinheiten, eine niedrigere Translationskapazität und damit einhergehend reduziertes Zellwachstums, sowie eine Hypersensitivität dieser Zellen gegenüber Antibiotika. Im Gegensatz dazu kann bei einer Deletion eines einzelnen Pseudouridins, unabhängig von Deletionen der Leit-snoRNA, ein Prozessierungsdefekt der 18S rRNA detektiert werden [56]. Phänotypisierungsstudien von snoRNA-Mutanten in Hefe zeigen, dass rRNA-Modifikationen insbesondere unter suboptimalen Wachstumsbedingungen die Proteinsyntheserate der Ribosomen aufrechterhalten [57]. Von vier snoRNAs in Eukaryoten ist bekannt, dass ihre Deletion zu Defekten der Ribosomenbiogenese führen, nämlich U3, U14, U17 und MRP-RNA. Diese vermitteln jedoch keine Basenmodifikationen, sondern Prozessierungsschnitte in der rRNA [58-61].

1.2.3 p53 und nukleolärer Stress

Der Nukleolus spielt eine zentrale Rolle für die Regulation des Zellzyklus sowie Vermittlung von Zellstress und die daraus folgende Stressreaktion [62]. Diese Reaktion geht vom Tumorsuppressor p53 aus. Unter physiologischen Bedingungen wird die zelluläre Konzentration von p53 durch die Interaktion mit der Ubiquitinligase Mdm2 und sukzessiver, ubiquitinvermittelter Degradation supprimiert. Bei zellulärem Stress jedoch, wie u.a. DNA-Schäden durch Radioaktivität, Hitzeschock, Hypoxie und Expression von Onkogenen, wird dieser Degradationsmechanismus durch das nukleoläre Protein p14ARF unterbrochen und damit p53 stabilisiert [63, 64]. Bei onkogenem Stress und viraler Infektion bindet p14ARF an Mdm2 und sequestriert Mdm2 im Nukleolus, sodass p53 seine Wirkung im Zellkern entfalten kann [65]. Dadurch werden Signalkaskaden ausgelöst, die entweder zur Apoptose der Zelle führen oder einen p21-vermittelten Zellzyklusarrest auslösen.

Interessanterweise konnte durch Experimente an UV-bestrahlten Zellen mit daraus folgender Thymindimerisierung der DNA gezeigt werden, dass nur dann eine effektive p53-Stabilisierung auftritt, wenn der Nukleolus zusätzlich bestrahlt wird und nicht ausschließlich nukleoplasmatische DNA [66]. Dies war ein Meilenstein für die Theorie des „nukleolären Stresses“ bzw. der Sensorfunktion des Nukleolus für Zellstress. Als Indikator für nukleolären Stress wird die nukleoläre Disruption gesehen. Die Disruption wird meist als Dislozierung von nukleolären Proteinen wie z.B. Nukleophosmin aus dem Nukleolus nachgewiesen [67].

Wie ein molekularer Mechanismus für diese Stressfunktion funktionieren könnte, haben Forschungsergebnisse verschiedenster Teilprozesse der Ribosomenbiogenese in Säugerzellen gezeigt. Durch Störung der Ribosomenbiogenese werden ribosomale Proteine nicht in die jeweilige Untereinheit inkorporiert. Freie ribosomale Proteine sowohl der kleinen 40S als auch der großen 60S Untereinheit können an Mdm2 binden und so die p53-Degradation verhindern [68-70]. Wenn ribosomale Proteine mutiert oder deletiert worden sind und damit eine korrekte Zusammensetzung nicht mehr möglich ist, erfolgt die Freisetzung der anderen ribosomalen Proteine aufgrund der fehlenden Inkorporation in die jeweilige Untereinheit. Im Fall der p53-Stabilisierung durch freigesetzte Proteine der kleinen Untereinheit ist die Präsenz von RPL11 nötig, um p53 zu stabilisieren.

Auch die Störung folgender Teilprozesse der Ribosomenbiogenese mit oder ohne nukleolärer Disruption führt zur Akkumulation von p53. Pol I-Inhibitoren wie Actinomycin D und DNA-Alkylantien wie Cisplatin [66] oder Mycophenolat [71], Blockade des Pol I-Transkriptionsfaktors UBF mittels Antikörpermikroinjektion [66] und Knock-Out des Pol I-Transkriptionsfaktors TIF1A [72] führen zur Reduktion der rDNA-Transkription. Nukleolärer Stress wird auch bei Störung der frühen rRNA-Prozessierung durch den Casein-Kinase-II-Hemmer 5,6-dichloro-1-beta-D-Ribofuranosyl-Benzimidazol (DRB) beobachtet [67].

1.2.4 Ribosomenbiogenese und genetische Krankheiten

Störungen des koordinierten Ablaufs der Ribosomenbiogenese können zu spezifischen erblichen Syndromen im Menschen führen (Ribosomopathie). Die zugrundeliegenden molekularen Defekte wurden in ribosomalen Struktur- und Prozessierungsproteinen wie auch in snoRNAs gefunden, die entweder für die korrekte Produktion, Prozessierung und Zusammensetzung der einzelnen Komponenten oder für Modifikationen der rRNA verantwortlich sind (siehe Tabelle 1).

Vollständige biallelische Deletionen ribosomaler Strukturproteine sind in der Regel letal für den Embryo [73]. Es gibt keine bekannte Krankheit, der eine biallelische Deletion ribosomaler Faktoren zugrunde liegt [74]. Daher liegen meist partielle Deletionen, alternatives Splicing, Nonsens-, Missens, Punkt- oder Insertionsmutationen bei den Patienten vor, die zu einer Haploinsuffizienz führen [73]. Die klinischen Symptome und pathognomonischen Veränderungen entwickeln sich bei diesen Syndromen in der Regel schon sehr früh im Krankheitsverlauf, oft während der Embryogenese [75-77]. Wie die Mutationen pathogenetisch zum klinischen Bild führen, ist noch weitestgehend unklar. Eine mögliche Erklärung könnte die verminderte Anzahl von funktionsfähigen Ribosomen sein, die das Wachstum der Zellen durch reduzierte Translation beeinträchtigt [75]. Es wird außerdem postuliert, dass die Haploinsuffizienz dieser Faktoren nukleolären Stress verursacht und so einen p53-abhängigen Apoptose-Mechanismus auslöst. Darüber hinaus zeigt sich auch eine gewebsspezifische Krankheitsausprägung, obwohl Ribosomen in allen Geweben benötigt werden [78]. Denkbar wäre, dass die betroffenen Gewebe wie das hämatopoetische System während der Embryogenese oder Regeneration nach einer Noxe besonders empfindlich für zellulären Stress aufgrund einer gestörten Ribosomenbiogenese sind. Das erklärt jedoch nicht, warum bisher nur in wenigen schnellteilenden Geweben ähnliche Defekte nachgewiesen werden konnten [73].

Die erste nachgewiesene Ribosomopathie ist die Blackfan-Diamond-Anämie, der ein Versagen der Erythrozytenbildung im Knochenmark zugrunde liegt [79]. Dort fand sich initial bei einer Untergruppe von Patienten eine Mutation in RPS19. Bis heute konnten weitere Mutationen in anderen ribosomalen Strukturproteinen der kleinen und großen Untereinheit bei ca. 50% der Patienten ermittelt werden. Interessanterweise führen Mutationen unterschiedlicher ribosomaler Proteine gleichsam zu Anämie, aber zu unterschiedliche Entwicklungsdefekte, von Lippen-Gaumenspalten über Herzfehler bis hin zu Kleinwuchs [74]. Als Ursache der Anämie wird eine hohe Anfälligkeit proliferierender und sich differenzierender erythrozytärer Vorläuferzellen für Störungen der Proteinsynthesemaschine postuliert, da die Zellen einen hohen Bedarf an Proteinen haben. Als Therapie werden Kortikosteroide wie Dexamethason eingesetzt. Ob diese Therapie kausal in den molekularen

Pathomechanismus eingreift, ist unklar. Kürzlich konnten erstmals hetero- und homozygote Mutationen in Genen bestimmter Pol I und Pol III Untereinheiten (RPAC2=hRPA19=POLR1D, POL1RC=RPA39) als Ursache für das Treacher–Collins-Syndrom identifiziert werden. Bei diesem Syndrom ist die Anzahl der Neuralleistenzellen reduziert, sodass kraniofaziale Deformitäten entstehen [80].

In den letzten zehn Jahren konnten weitere erbliche Syndrome bestimmten Störungen der Ribosomenbiogenese zugeordnet werden. Mit Ausnahme der X-chromosomal-rezessiven Form der Dyskeratosis congenita sind die bekannten Erbgänge autosomal-rezessiv oder – dominant. Die Inzidenz der Erkrankungen liegt bei 1 zu 10^6 . Interessanterweise geht die Mehrheit der angegebenen Syndrome mit erhöhtem Krebsrisiko einher.

Dass auch neurologische Erkrankungen Folge einer gestörten Ribosomenbiogenese sein können, zeigen Forschungsergebnisse aus Mäusen. Wird der zentrale Pol I Transkriptionsinitiationsfaktor TIF-1A in Mäusen deletiert, führt die daraus folgende rDNA-Transkriptionsinhibition zu nukleolärem Stress. Die Mäuse zeigen dann einen parkinsonähnlichen Phänotyp [81, 82]. Dabei gehen nach Deletion von TIF-1A neuronale Progenitorzellen, hippokampale und dopaminerge Neurone unter, die Motorik und Gedächtnisfunktion steuern [83, 84]. In Cortexproben von Alzheimerpatienten findet man zudem deutliche Hypermethylierungen der rDNA, die dementsprechend mit einer verringerten rDNA-Transkription einhergehen [85].

Gruppe	Erkrankung	Gen	Funktionsstörung	Manifestation	Ref.
Ribosomale Proteine	Diamond-Blackfan-Anämie	RPS19, RPS7, RPS17, RPS24,	Prozessierung 18S rRNA	Hypoplastische, makrozytäre Anämie, kraniofaziale und Extremitäten-Missbildungen, Herzfehler,	[74, 78, 79]
		RPL5, RPL11, RPL35	Prozessierung 28S rRNA	Tumorprädisposition	
	5q ⁻ -Syndrom	RPS 14	Prozessierung 18S rRNA	Makrozytäre Anämie, Myelodysplast. Syndrom, Tumorprädisposition (AML) prädominant Frauen	[86-88]
Produktion – Prozessierung - Zusammensetzung	ANE-Syndrom („ <i>Alopezie</i> , <i>Neurologische Störungen</i> , <i>Endokrinopathie</i> “)	RBM 28	Reifung 60S Untereinheit	Haarverlust, Wachstums- und mentale Retardierung, Skelett- und Hautveränderungen, zentrale Nebennierenrindeninsuffizienz	[89]
	Shwachman-Bodian-Diamond-Syndrom	SBDS		Neutropenie Wachstumsretardierung, exokrine Pankreasinsuffizienz, , Skelettveränderungen, Tumorprädisposition	[90-93]
	Bowen-Conradi-Syndrom	EMG1	Reifung 40S Untereinheit	Wachstumsretardierung, psychomotorische Verzögerung, Skelettveränderungen	[94, 95]
	Männliche Infertilität	UTP14	Prozessierung 18S rRNA, Reifung 40S Untereinheit	Oligospermie, Azoospermie	[96]
	Neurofibromatose (Mikrodeletionsvariante)	UTP6		geistige Retardierung, Bindegewebeveränderungen, Herzfehler, Tumorprädisposition	[97]
	Native American Indian childhood cirrhosis (NAIC)	UTP4/ Cirhin		Neugeborenen-Ikterus, biliäre Zirrhose	[98]
	Primäres Offenwinkelglaukom	UTP21 (Kandidaten-Gen)		Glaukom	[99, 100]

rRNA Prozessierung und Modifikation	Dyskeratosis congenita	DKC1	Telomerasefunktion, Proteinkomponente von H/ACA RNPs, Pseudouridinylierung von rRNA	Mukokutane Symptomtrias (abnorme Hautpigmentierung, Nageldystrophie, Mukosaleukoplakie), Knochenmarksinsuffizienz, Tumorprädisposition	[101-104]
		NOP10			
		NHP2			
	Anauxetische Dysplasie	RMRP (nicht-kodierende	Reifung 5.8S rRNA, Degradation zellzyklusregulierter RNA, mitochondriale DNA Replikation	Minderwuchs, Hypodontie, geistige Retardierung, Chondrozytopenie	[105-107]
	Metaphysäre Dysplasie ohne Hypotrichose	RNA-Komponente der RNase MRP)		Minderwuchs, metaphysäre Dysplasie	
	Knorpel-Haar-Dysplasie (metaphysäre Dysplasie Typ McKusick)			Minderwuchs, metaphysäre Dysplasie, Haar-Hypoplasie, Anämie, Immundefekt, M. Hirschsprung, Tumorprädisposition	
	Prader-Willi-Syndrom	HBII-85 snoRNA-Cluster (RNA-Komponente von Box C/D snoRNPs	Methylierung, Faltung, Prozessierung rRNA,	Minderwuchs, Neonatale Hypotonie, Hyperphagie, Adipositas, geistige Retardierung, Hypogonadismus	[108-110]
	Treacher-Collins-Syndrom (Dysostosis mandibulofacialis)	TCOF1	rDNA Transkription, Methylierung 18S rRNA, Neuralleistenformation	Kraniofaziale Dysmorphie, Schallleitungsschwerhörigkeit,	[75, 80]
		POLR1D POLR1C	Untereinheit der Pol I und III, rDNA Transkription		

Tabelle 1: Ribosomopathien – Genetischer Defekt und klinisches Bild

Mutationen von Proteinen oder snoRNAs, die bei der Ribosomenbiogenese eine Rolle spielen, können spezifische Syndrome verursachen. Angegeben sind in den Spalten von links nach rechts der betroffene Teilbereich der Ribosomenbiogenese, die Bezeichnung des Syndroms, das betroffenen Gen, die Funktion des Genproduktes, das klinische Bild sowie die zugehörige Referenz.

1.2.5 Ribosomenbiogenese und Krebs

Sich schnell teilende und wachsende Krebszellen benötigen aufgrund ihres hohen metabolischen Bedarfs große Mengen an Proteinen und damit Ribosomen. Dementsprechend sind die rRNA-Transkriptionsraten und RP-Expressionslevel sehr hoch [111]. Eine Krebszelle muss eine bestimmte Zellgröße erreichen, bevor sie sich teilt. Wäre

dies nicht der Fall, würden die Tochterzellen sukzessive kleiner werden. Die gesamte Tumormasse würde dann nicht zunehmen und der Tumor allmählich untergehen.

Eine Dysregulation der Ribosomenbiogenese ist mit Veränderungen des Zellzyklus, der Zellproliferation und des Zellwachstums assoziiert und kann dadurch zu Tumorentwicklung führen [112, 113]. Für verschiedene solide und hämatologische Tumoren sind Mutationen in verschiedenen Proteinen der Ribosomenbiogenese beschrieben (Tabelle 2).

Als morphologisches Korrelat für Malignität wurden Vergrößerung und Formveränderungen des Nukleolus schon im späten 19. Jahrhundert beschrieben [114]. Daher dient der Nukleolus als diagnostisches Kriterium bei der histologischen Begutachtung von Tumorgewebe [115]. Veränderungen der Struktur und Funktion des Nukleolus sind Konsequenz einer sowohl gesteigerten als auch dysregulierten Proliferationsaktivität. In Brustkrebspatientinnen korreliert die Größe der Nukleoli invers mit der klinischen Prognose. So zeigen Tumorzellen von Brustkrebspatientinnen [116, 117] eine Korrelation zwischen nukleolärer Hypertrophie und Störungen von p53- und pRb-Signalwegen und folglich schlechterer klinischer Prognose. Hinweise, dass strukturell-funktionelle Veränderungen des Nukleolus nicht nur Folge, sondern auch Ausgangspunkt für maligne Transformation sein kann, liefern Erkenntnisse aus Patienten mit hepatozellulärem Karzinom (HCC). Das HCC geht häufig aus einer Leberzirrhose hervor, die durch eine chronische Infektion mit Hepatitisviren, chronischem Alkoholabusus oder angeborenen Stoffwechselerkrankungen (z.B. Morbus Wilson) verursacht wird. Insbesondere Hepatitisvirus-induzierte Leberzirrhosen zeigen eine enge Korrelation von abnorm veränderten Nukleoli im Zirrhosestadium mit der Entwicklung eines späteren HCC. Proteine der Hepatitis C- und B-Viren können Pol I und III aktivieren. Die HCV-Proteine *core protein* und NS5A steigern die Rekrutierung von UBF1 an den Pol I Promotor und damit die Pol I Transkriptionsrate [118, 119]. Zwar werden durch diese Virusfaktoren auch andere Gene aktiviert, insbesondere Zellzyklusgene, jedoch erscheint in der Kanzerogenese einiger HCCs die Deregulierung des Zellwachstums vor der Proliferation stattzufinden. Nukleoläre Hypertrophie der Hepatozyten wird in dysplastischen Leberarealen nachgewiesen, die keine proliferative Aktivität zeigen [120]. Daher ist anzunehmen, dass gesteigerte Ribosomenbiogenese und nukleoläre Hypertrophie für die maligne Transformation von Zellen eine Rolle spielen.

Dass dysregulierte Proteine der Translationsmaschinerie direkt Zellen transformieren können, wurde am eukaryoten Initiationsfaktor 4E (eIF4E) gezeigt, dessen Überexpression zu Tumorförmung in Mäusen führt [121, 122]. Ob Defekte in den verschiedenen Teilprozessen der Ribosomenbiogenese zu maligner Transformation in humaner Zellkultur oder zu direkter Krebsentwicklung im Menschen führen, ist noch nicht vollständig geklärt. Patienten mit den oben genannten Ribosomopathien haben oft ein erhöhtes Krebsrisiko. Von Dyskeratosis congenita betroffene Patienten entwickeln hämatopoetische und epitheliale

Tumore. Das dabei mutierte Protein Dyskerin besitzt zwei Hauptfunktionen. Als Bestandteil des Telomerase-Komplexes schützt es Telomere vor der sukzessiven Verkürzung bei wiederholten Zellteilungen und damit Zellalterung. Des Weiteren ist Dyskerin als Teil des H/ACA-snoRNPs für die Pseudouridinylierung von rRNA verantwortlich. In Mausmodellen mit reduzierter Dyskerin-Expression konnte gezeigt werden, dass in Jungtieren mit noch langen Telomeren die Tumorzinzidenz ansteigt. In diesen Mäusen ist somit die Tumorentwicklung aufgrund defekter Pseudouridinylierung der rRNA wahrscheinlicher als durch eine Telomerase-Dysfunktion [102, 104]. In Prostatakarzinomzellen führt ein siRNA-vermittelter Knock-Down von Dyskerin nicht zu Apoptose oder Seneszenz, sondern zum Schrumpfen der Zellen und verminderter Proliferation [123]. Als molekularer Mechanismus wird eine Reduktion der IRES-initiierten mRNA-Translation von Tumorsuppressorgenen wie p27 vermutet. Auch beim Shwachman-Bodian-Diamond-Syndrom verändert sich die translationelle Funktion von Ribosomen aufgrund der Mutation des SBDS-Gens [124].

Einen weiteren Hinweis für das onkogene Potential einer dysregulierten Ribosomenbiogenese geben Ergebnisse aus humanen Brustkrebszellen. In den Zellen mit hoher Aggressivität werden veränderte prä-rRNA-Formen mit unterschiedlicher Methylierung gebildet. Die entstehenden Ribosomen verfügen zwar über die gleiche Gesamttranslationskapazität, präferieren jedoch andere Translationsmodi. Dabei unterscheidet man grundsätzlich *Cap*-abhängige von *Cap*-unabhängiger Translation. Die Translation der Mehrheit zellulärer mRNAs benötigt die Interaktion der 5' 7-Methyl-GTP-Kappe der mRNA mit dem Initiationsfaktor eIF4F (sog. *Cap-Translation*). Die *Cap*-unabhängige, auch IRES-initiierte Translation [125] genannt, nutzt eine interne Ribosomen-Eingangs-Sequenz (IRES) im 5' UTR-Bereich der mRNA. Diese Sequenz besitzen Gene, die eine Rolle während der Mitose spielen, darunter p53 und p27 [126-129]. IRES-initiierte Translation von p53-mRNA wird in aggressiven Brustkrebszellen mit veränderter rRNA ineffizient, sodass die p53-Level sinken [130]. Es wäre möglich, dass die aberrante rRNA die Struktur und damit die Funktion des Ribosoms verändert. Ein mRNA-Translationsprofil wäre die Folge, das die maligne Transformation oder Progression fördert.

Sowohl Tumorsuppressorgene wie p53, pRb, PTEN, p14ARF als auch Onkogene wie NPM, Akt und c-Myc oder wichtige Proteinkinase-Signalwege wie mTOR und ERK-MAPK kontrollieren die Ribosomenbiogenese auf verschiedenen Ebenen [131-134].

Die Tumorsuppressorgene p53 und pRb binden und inhibieren aktiv die Proteine SL1 und UBF1. SL1 und UBF1 rekrutieren gemeinsam Pol I an den rDNA-Promotor [135, 136] und steigern damit die rRNA-Synthese. Entsprechend reduzieren aktiviertes p53 und pRb die Pol I Transkription.

Das Protoonkogen c-Myc hingegen fördert über die Aktivierung aller drei RNA-Polymerasen und Veränderungen der rDNA-Chromatinstruktur die Bildung der Protein- und RNA-

Bestandteile der Ribosomen [137-140]. Insbesondere die Expression von nahezu allen Proteinen der rRNA-Prozessierung wird deutlich gesteigert und damit die Effizienz der rRNA-Reifung [141, 142]. Unabhängig von der Aktivierung anderer Zellzyklusgene verursacht c-Myc allein durch die Steigerung der Proteinsynthese eine Dysregulation des Zellzyklus und vermehrte genomische Instabilität [143]. Dieser Effekt basiert auf der Hemmung von IRES-initiierte Translation (siehe oben) der Cdk11-mRNA während der Mitose. Die Reduktion des Zellzyklusregulators Cdk11 erhöht die Anzahl von Zentrosomen als Zeichen genomischer Instabilität. Umgekehrt kann die onkogene Aktivität von c-Myc durch Haploinsuffizienz einiger RPs gehemmt werden [143]. Zudem wird die Transkriptionsfaktoraktivität von c-Myc über einen negativen Feedbackmechanismus von freiem RPL11, das bei fehlerhafter Ribosomenbiogenese freigesetzt wird, inhibiert [69].

Zusammenfassend gibt es also mehrere Theorien darüber, wie Störungen der Ribosomenbiogenese zur Tumorentwicklung beitragen können. Erstens könnte durch fehlerhafte Ribosomen die Translation von wichtigen Tumorsuppressor- und Onkogenen verändert werden. Wie oben geschildert, werden bei Änderung bestimmter Translationsmodi die Tumorsuppressorprotein-Level reduziert. Eine globale Senkung der Translationskapazität könnte die Level einiger Tumorsuppressorproteine unter einen kritischen Grenzwert bringen, sodass ihre Funktionskapazität nicht mehr ausreicht, um eine Tumorentwicklung zu verhindern. Zweitens haben viele ribosomale Proteine extraribosomale Funktionen [15]. Durch fehlerhafte Ribosomenbiogenese könnten beispielsweise nichtinkorporierte ribosomale Proteine oder rRNAs bestimmte zelluläre Checkpoints aktivieren. Dass auch pathologische Veränderungen der Chromatinstruktur zur Tumorentwicklung beitragen, ist seit längerem bekannt. Die rDNA-Chromatinstruktur ist in Tumorzellen interessanterweise hypomethyliert und damit aktiver sowie genomisch instabiler [144, 145].

1.2.6 Ribosomenbiogenese und Tumorthherapie

Aufgrund der Bedeutung der Ribosomenbiogenese und des Nukleolus für die Entstehung und das Wachstum von malignen Tumoren, werden therapeutische Ansätze erforscht, die gezielt Komponenten der Ribosomenbiogenese angreifen. In Zellkulturexperimenten konnte gezeigt werden, dass etablierte Chemotherapeutika wie Oxaliplatin oder Doxorubicin Teilschritte der Ribosomenbiogenese hemmen oder zu morphologischen Veränderungen des Nukleolus führen [67]. Prozesse wie rDNA-Transkription werden durch Alkylantien (z.B. Oxaliplatin), frühe rRNA-Prozessierung durch Kinaseinhibitoren (z.B. Roscovitin) oder späte rRNA-Prozessierung durch Proteasominhibitoren (z.B. Bortezomib) gehemmt. Temserolimus oder Sirolimus blockieren den mTOR-Signalweg, der über externe Wachstumsstimuli die Ribosomenbiogenese steigert. Kinasehemmer stören die Synthese von rRNA in Tumorzellen, indem zum Beispiel die ERK-abhängige Phosphorylierung des Pol I

Transkriptionsfaktors TIF-IA gehemmt wird. Im klinischen Alltag werden heute schon chromatinmodulierende Substanzen eingesetzt, u.a. Inhibitoren von DNA-Methyltransferasen oder Histondeacetylasen [146]. Ob diese auch rDNA-Chromatin beeinflussen, ist nicht ausreichend geklärt. Aufgrund der obigen Erkenntnisse wäre es durch eine rationale Kombination von Chemotherapeutika und Biologicals mit sequenzieller oder synergistischer Blockade verschiedenster essentieller Zellprozesse möglich, eine effektivere Tumorthherapie zu erreichen. Erst kürzlich wurde ein neuer potentieller Inhibitionsmechanismus einer Substanz namens Quarfloxin publiziert. Quarfloxin unterbindet die Komplexbildung des nukleolären Proteins Nucleolin mit Quadruplex-rDNA (rDNA höheren Organisationsgrades). Dadurch wird die rDNA-Transkription gehemmt und Apoptose in Krebszellen ausgelöst. Eine klinische Studie zur Behandlung von Karzinoiden wurde initiiert [147]. Zudem liegt seit Kurzem ein oraler Inhibitor der Pol I Transkriptionsinitiiierung vor, der p53-unabhängig wirkt und zurzeit präklinisch evaluiert wird [148].

Tumor	Gene (Mutation oder Überexpression)	
	Ribosomales Protein	Faktor für rRNA-Transkription, - Prozessierung,- Modifikation
AML/MDS	RPS14(5q- Syndrom)	DKC1/TERT, SBDS, NPM1
NHL		RMRP
Basalzell-Ca		RMRP
Plattenepithel (Head/Neck)		DKC1/TERT
Ösophagus-Ca	RPL15	
Gastrointestinale Tumore	RPL13	POLR1D
Hirntumore		WDR3(Utp12)
HCC	RPL13,RPL35a, RPS8,RPL12, RPL23a,RPL27,RPL30	
Kolorektales-Ca	RPS3,RPS6,RPS8, RPS12,RPL5,RPL22, RPL26,RPL35	
Prostata-Ca	RPL37,RPL7	
Cervix-Ca	RPS12	
Mamma-Ca		Phänotyp beschrieben
Schilddrüsen-Ca		WDR3(Utp12)

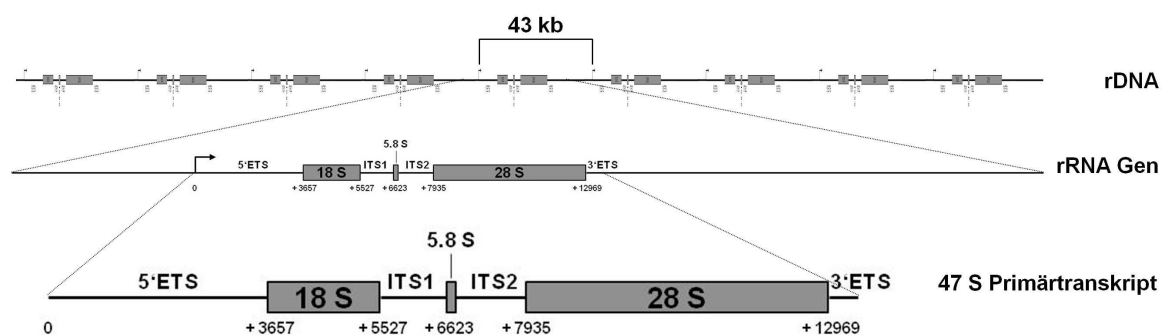
Tabelle 2: Assoziation mutierter oder überexprimierter Gene der Ribosomenbiogenese mit soliden und hämatologischen Tumoren

1.3 Transkription der rDNA durch RNA-Polymerase I

Die Transkription von rDNA durch die DNA-abhängige RNA-Polymerase I führt zur Produktion von rRNA [149]. Die rDNA-Transkription wird auf multiplen Ebenen reguliert. Schnelle Aktivitätsänderungen der Pol I können durch posttranskriptionelle Modifikationen von Pol I Untereinheiten sowie assoziierter Transkriptionsfaktoren erfolgen, langfristige Regulation wird durch Chromatinveränderungen hervorgerufen [145]. Zellulärer Stress und Störungen des Zellmetabolismus wie Nährstoffentzug und Proteinsynthesehemmung führen zu einer Senkung der Pol I Aktivität, hingegen kommt es durch den Einfluss von Wachstumsfaktoren zu einer Steigerung.

1.3.1 Aufbau der rDNA

Einige Hundert rRNA-Gene sind in der Lage, bis zu 80% der Gesamt-RNA einer Zelle zu produzieren [11]. Aufgrund ihrer Abundanz in nahezu allen Lebewesen werden die Sequenzen der rRNA-Gene zur phylogenetischen Einteilung von Arten verwendet [40]. Pro haploidem menschlichen Genom befinden sich ca. 400 aneinandergereihte rRNA-Gene auf den fünf akrozentrischen Chromosomen 13, 14, 15, 21 und 22 [150]. Der für die rRNA codierende Bereich hat eine Länge von 14kb und wird beidseits umgeben von intergenen Sequenzen (*spacern*) von jeweils 30 kb Länge. Diese beiden Teilsequenzen ergeben eine rDNA-Wiederholungseinheit von etwa 43 kb Länge (Abb. 1).



Region	Sub-Region	Postion rDNA	
Promoter	Upstream Control Element	-156	-107
	Essential Core Element	-45	18
kodierende prä-rRNA Region	5'ETS	1	3656
	18 S RNA	3657	5527
	ITS1	5528	6622
	5.8 S RNA	6623	6779
	ITS2	6780	7934
	28 S RNA	7935	12969
	3'ETS	12970	13314

Abb. 1: Schema der Struktur von rDNA und rRNA

Die im Nukleolus vorhandene ribosomale DNA (rDNA) besteht aus mehreren hundert Kopien von rRNA-Genen, die tandemartig aneinander gereiht sind. Das einzelne rRNA-Gen besteht aus einer kodierenden prä-rRNA-Region von ca. 13,5kb Länge sowie dazwischenliegenden, intergenen *spacer* von 30 kb Länge. Die DNA-abhängige RNA-Polymerase I transkribiert diese rRNA-Gene und produziert zunächst das 47 S Primärtranskript, aus dem die einzelnen rRNA-Subspezies wie 18S, 28S und 5.8S rRNA herausgeschnitten werden. Die Tabelle zeigt die Basenposition der Sequenzabschnitte des rRNA-Gens.

Die Pol I Promotoren befinden sich, umgeben von Enhancerelementen, in den intergenen *spacer* Regionen. Dies konnte für mehrere Spezies gezeigt werden [151-155]. Neben dem eigentlichen rRNA-Gen-Promotor befinden sich noch weitere Promotoren in größerer Entfernung in 5'-Richtung im intergenen Bereich. Sie werden *spacer* Promotoren genannt [156, 157]. Diese sind für die Transkription intergener Sequenzen verantwortlich, deren RNA-Produkte die Chromatinstruktur der rDNA beeinflussen [158]. Zwischen dem rRNA-Genpromotor und den *spacer* Promotoren liegen repetitive Enhancerelemente.

Der eigentliche Pol I Promotor erstreckt sich im Menschen von Basenposition -150 bis ca. +18 relativ zum Transkriptionsstart der rDNA [159-161]. Der humane Promotor enthält zwei distinkte Elemente, nämlich das *upstream promoter/control Element* (UPE) sowie das *essential core element* (Core) [162]. Letzteres ist ausreichend für eine in vitro Transkription, ersteres scheint eine modulierende Funktion zu besitzen. Die Promotorsequenz ist speziesspezifisch. Dies entspricht auch der unterschiedlichen transkriptionellen Regulation der rDNA in den einzelnen Spezies [163]. Mehrere transkriptionsbeendende DNA-Elemente befinden sich am 3' Ende der kodierenden rRNA-Region sowie zwischen den Spacer-Promotoren und dem eigentlichen Pol I Promotor.

1.3.2 RNA-Polymerase I Struktur und Funktion

Die ribosomale RNA wird, mit Ausnahme der 5S rRNA, durch die RNA-Polymerase I (RPI, bzw. Pol I) synthetisiert. Die 5S rRNA ist ein Produkt der RNA-Polymerase III [164]. In Hefezellen besteht die Pol I aus 14 Untereinheiten, von denen RPA34, RPA49, RPA14 und RPA43 Pol I spezifisch sind. Die anderen Untereinheiten finden sich in der Pol II und/oder Pol III [165, 166]. Erst kürzlich konnte die Struktur der Pol I in Hefe in einer Auflösung von 12 Ångström mittels Kryoelektronenmikroskopie und Kristallstrukturanalyse detailliert dargestellt werden [165]. Für alle Untereinheiten außer RPA14 sind humane Homologe bekannt. Die humanen Homologe von RPA34 und RPA49 sind PAF53 bzw. PAF49/CAST (siehe unten). Spezifische Funktionen einzelner Domänen, die der Pol I ihre hohe Transkriptionsrate verleihen, wurden entsprechend für zwei exklusive Pol I Untereinheiten ermittelt. RPA34 und RPA49 wird eine intrinsische Elongationsfunktion aufgrund von abschnittweisen Sequenzhomologien zu den RNA-Polymerase II Elongationsfaktoren TFIIF und TFIIE zugeschrieben [165, 167]. Das für die Transkriptionsinitiation erforderliche Rrn3 (TIF-IA in

Säugern) muss an RPA43 binden, um Pol I an den Promotor zu rekrutieren. Anschließend tragen RPA34 und RPA49 als Heterodimer dazu bei, dass Rrn3 wieder von Pol I während des Transkriptionsstarts abgelöst wird. Der erste Aktivitätszustand der Pol I während der Transkription wird *promoter escape*, also Promotorflucht genannt [168]. Aufgrund der Sequenzhomologie vom Heterodimer RPA34/49 zum Pol II Elongationsfaktor TFIIF könnten beide Untereinheiten als Pol I intrinsischer Elongationsfaktor dienen. Die Pol I besitzt zusätzlich eine starke intrinsische 3'-RNase-Aktivität, die auch bei Pol II und Pol III bekannt ist [165]. Bei Pol II und III dient sie als Korrekturfunktion, wenn die Polymerasen auf sterische Hindernisse auf der DNA treffen. Dann fahren die Polymerasen einige Nukleotide zurück und können die Elongation nach Entfernen der fehlerhaft transkribierten RNA fortsetzen. Die wahrscheinlich für diese RNase-Aktivität maßgeblich zuständige Pol I Untereinheit (RPA12) wird auch für die Termination der Pol I Transkription benötigt [169].

1.3.3 Epigenetische Kontrolle der rDNA-Transkription

Der Begriff Epigenetik umfasst vererbare Aktivitätszustände von Genen ohne Basensequenzveränderungen der DNA. Veränderung der Chromatinstruktur und Histonmodifikationen können dabei zu sogenanntem offenem Euchromatin (in der Regel aktiv) oder zu kondensiertem Heterochromatin (in der Regel inaktiv) führen. Der Vorgang der Inaktivierung eines Gens durch Chromatinveränderungen wird *silencing* genannt. Obwohl die Zelle mehrere hundert Kopien der rRNA-Gene besitzt, ist die Mehrzahl dieser Gene selbst in stoffwechselaktiven Zellen inaktiv [145]. Viele rRNA-Gene werden in den nukleolären Organisationregionen (NOR) akrozentrischer Chromosomen zusammengefasst. Man unterscheidet auf dieser höheren Organisationsebene der rDNA aktive von inaktiven NORs. Die Formation des Interphasenukleolus geschieht unabhängig von der Aktivität der NORs. Aufgrund ihrer Transkriptionsaktivität sind aktive NORs entsprechend mit Pol I assoziiert, inaktive NORs nicht. Mithilfe einer Silberfärbung können diese aktiven NORs markiert werden. Daraus ergibt sich die Bezeichnung AgNOR [170]. Auf Chromatinebene zeigen AgNORs eine zehnfach niedrigere Kondensation der rDNA als inaktive NORs, was unter anderem durch DNA-Hypomethylierung, Histon H4-Acetylierung und Histon H3-Methylierung geschieht. Umgekehrt ist die DNA inaktiver NORs stark methyliert, an Histon H4 deacetyliert und an den Histonen H3K9 und H4K20 methyliert [171].

Es gibt zelltypspezifische Unterschiede in der Anzahl aktiver rRNA Gene [172]. Nach Aktivierung durch die mitogene Substanz Phytohämagglutinin steigern Lymphozyten die Anzahl aktiv transkribierter rRNA Gene. Während der Spermatogenese sinkt die Anzahl aktiver rRNA Gene hingegen auf annähernd Null. Daher kann man auf zelltyp- und differenzierungsspezifisches rDNA *silencing* schließen. Ob die Anzahl aktiver Gene in Säugern und der Hefe bei Wachstumsstimulation generell ansteigt, ist nicht eindeutig geklärt

[173, 174]. Wahrscheinlicher ist, dass es zu einer vielfachen Steigerung der rRNA-Produktion an schon aktivierten rRNA-Genen kommt. Neue Ergebnisse konnten zeigen, dass der Proteinkomplex eNoSC in Abhängigkeit vom intrazellulären Energiestatus ribosomales Chromatin aktivieren oder ruheinstellen kann [175].

1.3.4 Kinetik und Kontrolle der RNA-Polymerase I

Der Transkriptionsprozess wird mit der Bildung eines Präinitiationskomplexes (PIC) am Promotor eingeleitet. Der PIC besteht aus mehreren Komponenten und rekrutiert die Pol I an den Promotor. Die einzelnen Bestandteile sind: der promotorbindende Proteinkomplex SL1 (Promotor-Selektivitätsfaktor), bestehend aus dem Pol I unspezifischen TATA-Box-Bindungsprotein (TBP) und den Pol I spezifischen TBP-assoziierten Faktoren (TAF); der rDNA-bindende Transkriptionsfaktor *upstream binding factor 1* (UBF1), der Pol I Untereinheit Polymerase-I-assoziierte Faktor 53 (PAF53) und der Transkriptionsinitiationsfaktor TIF-IA [176-178]. SL1 erzielt die rDNA-spezifische Bindung der Pol I über eine Interaktion mit TIF-IA [179]. UBF1 scheint eine größere Rolle für die eigentliche Aktivierung der Pol I sowie die Chromatinstruktur der rDNA zu spielen. Dimere von UBF1 bilden mit Hilfe ihrer *high mobility group* Proteindomänen (HMG) ein sogenanntes *enhancesome*, also eine transkriptionsverstärkende Struktur. Das *enhancesome* bringt 140 Nukleotide der rDNA vor dem Transkriptionsstart in eine zirkuläre Form. Die beiden Promotorsequenzbestandteile *upstream control element* und *essential core element* liegen dann unmittelbar nebeneinander [180]. Viele weitere Proteine wie nukleäres Myosin und Actin, DNA-Reparatur- und DNA-Replikationsenzyme (Topoisomerase I und II, PCNA, TFIIH), chromatinmodifizierende Proteine (PCAF, G9a) und Kinasen (CK2) assoziieren mit Pol I und bilden einen Multi-Proteinkomplex, der rRNA-Synthese und -Reifung, rDNA-Reparatur und Chromatinveränderungen koordiniert [145].

Erfolgreiche PIC-Formation führt zur Transkriptionsinitiation, sodass die ersten Ribonukleotide zu einem RNA-Molekül verbunden werden. RNA-Polymerasen befinden sich nach Initiierung im Zustand des *promoter escape*. Dabei kommt es zu wiederholten Abbrüchen und Reinitiierungen der Transkription, bis die hochprozessive Elongationsphase eintritt. Diese Promotorflucht ist für die RNA-Polymerase II der produktivitätsbestimmende Schritt [181]. Für Pol I ist in einem *in vitro* Transkriptionssystem ein zumindest ähnlicher Effekt beschrieben worden [182, 183]. Jedoch wurden keine kurzen Transkripte entdeckt, die für eine abortive Transkription im Rahmen der Promotorflucht charakteristisch sind [174].

Der Beginn der anschließenden Elongation geht mit dem Verlust von TIF-IA einher [184]. Die Pol I verlässt den Promotor, SL1 und UBF1 bleiben am Promotor gebunden und können einen neuen PIC bilden. Die Elongation benötigt chromatinmodulierende Faktoren und Veränderungen der rDNA-Struktur, die durch Topoisomerasen herbeigeführt werden können

[185]. Nur dann kann die Pol I effizient entlang der rDNA transkribieren. Die ständige Präsenz von DNA-Reparatur-Komplexen wie XPG, CSB und TFIIH wird benötigt, da in der rDNA Schäden auftreten [186]. Topoisomerasen und Reparaturproteine verhindern die sterische Blockade der Pol I durch Hindernisse im Chromatin oder DNA-Abbrüche.

Die Transkription endet mit Bindung des Terminationsfaktors TTF1 an Terminationselementen am 3' Ende der codierenden rDNA. Pol I pausiert und wird durch TTF1 und den transkriptlösenden Faktor PTRF von der rDNA abgelöst. Anschließend kann die Pol I wieder reinitiiert werden [187].

Die Pol I und viele der oben genannten Pol I assoziierten Faktoren können posttranslational modifiziert werden. Dies ermöglicht eine unmittelbare Regulation der Pol I Aktivität. TIF-IA, das an eine Untereinheit der Pol I binden muss, bevor Pol I an den Präinitiationskomplex andockt, wird durch wachstumsfaktorabhängige Phosphorylierung (wie mTOR, ERK, RSK) oder Stresssignalwege wie Jun-Kinase reguliert [188]. UBF1 beeinflusst die Pol I Aktivität durch Veränderung der Chromatinstruktur auf der gesamten Länge des rRNA-Gens und kann durch wachstumsfaktorstimulierte Phosphorylierung aktiviert werden [174, 176, 182, 189, 190]. Bei Aktivierung führt UBF1 zu einer Chromatinstruktur, die förderlich für die Pol I Transkription ist. Als Resultat steigt die Anzahl transkribierter rRNA-Gene [173].

Acetylierung von basalen Pol I Transkriptionsfaktoren wie UBF1 und SL1 verändert ebenso die Pol I Aktivität. UBF1 und SL1 sind Ziel von Acetyltransferasen. UBF1 wird durch das CREB-bindende Protein (CBP) acetyliert und damit Ziel der inhibierenden Wirkung des Tumorsuppressorgens pRb [191, 192]. Im Gegensatz dazu verstärkt sich die transkriptionsinitiiierende Wirkung der SL1-Komponente TAF(I)-68 bei Acetylierung durch die Histon-Acetyltransferase PCAF [193]. Interessanterweise wird diese Acetylierung von der Deacetylase SIRT1 wieder entfernt und damit die Pol I Transkription inhibiert. Ein ähnlicher Effekt ist für SIRT7 bekannt [194]. SIRT1 und SIRT7 sind Vertreter der Proteinfamilie der Sirtuine, welche eine wichtige Rolle bei der Regulation des Zellmetabolismus bei Nahrungsentzug spielen und im Fokus von Metabolismus- und Altersforschung stehen [195]. Die Aktivität der Pol I verändert sich zudem in Abhängigkeit vom Zellzyklusstadium. Die maximale Transkriptionsleistung wird während der S/G2 Phase erreicht, fällt während der Mitose stark ab und erholt sich wieder mit der G1 Phase. Dies wird unter anderem durch den Phosphorylierungsstatus von SL1 bestimmt. TIF-IB/SL1 wird durch Cdc2/Cyclin B phosphoryliert und dadurch inaktiviert, sodass keine aktive Pol I Transkription auf der rDNA stattfinden kann und das Euchromatin zu Heterochromatin umgewandelt wird [196, 197]. Damit können die Chromosomen kondensieren und in der Anaphase auseinanderweichen. Die Phosphatase Cdc14 hat eine ähnliche inhibierende Wirkung auf die rDNA-Transkription während der Mitose [198]. UBF1 wird in der G1/S-Phase verstärkt von dem Kinasekomplex CDK2/Cyclin E phosphoryliert, sodass die Interaktion von UBF1 mit rDNA in dieser

Wachstumsphase verstärkt wird [199]. Da die Zelle vor der Mitose genug Proteinsynthesepotential benötigt, stellt dies einen möglichen Schritt zur Bereitstellung von rRNA dar.

Es konnte noch nicht eindeutig geklärt werden, welcher Teilschritt (Initiation, Elongation, Termination) der Transkription entscheidend für die Produktivität der Pol I ist. In Säugern ist zudem nicht vollständig verstanden, wie die Zelle bei größerem Bedarf an rRNA die Pol I Aktivität hochreguliert. Für Hefezellen wird vermutet, dass die Aktivität der Pol I vor allem auf Ebene der Initiation durch den Initiationsfaktor TIF-1A kontrolliert wird [163]. Neue Erkenntnisse sprechen jedoch für andere Ebenen der Regulation. Proteinkodierende Gene zeigen eine unterschiedliche Pol II Dichte. Die meisten Gene zeigen eine geringe Pol II Dichte, teilweise wird ein Gen nur von einem Pol II Molekül zu einem bestimmten Zeitpunkt transkribiert. Gene von Proteinen mit einem hohen Zellumsatz, wie ribosomale Proteine, zeigen eine höhere Pol II Dichte [200-203]. Auf der rDNA hingegen können viele Pol I Moleküle zeitgleich transkribieren. Die Polymerasebeladung eines Gens wird durch die Ausbildung von Initiationskomplexen bestimmt. Da die rDNA von Säugerzellen mit bis zu einhundert Pol I Molekülen besetzt ist, scheint die PIC-Formation als Regulationsebene unwahrscheinlich zu sein [204]. Außerdem zeigen wachstumsstimulierte humane Zellen keine erhöhte Anzahl von Pol I Molekülen pro aktivem Gen [174]. Indirekt kann man daher von der Anzahl von Pol I Molekülen pro Gen auf die Initiationsrate schließen, die somit wahrscheinlich konstant ist. In Hefezellen hingegen wird eine Erhöhung der Transkriptionskapazität durch erhöhte Polymerasebeladung der rDNA und vice versa beschrieben [205]. Auch eine Erhöhung der Anzahl aktiver rRNA-Gene scheint in Säugern wohl nicht der entscheidende Regulationsmechanismus zu sein [206].

Wahrscheinlich ist eine Kontrolle der Elongationsrate entscheidend. Diese ist von der Chromatinstruktur abhängig. Nach Phosphorylierung von UBF1 in wachstumsstimulierten Säugerzellen wird das rDNA-Chromatin in einen für Pol I permissiveren Zustand versetzt. Der Pol I Elongationskomplex kann leichter passieren und die Elongationsrate steigt an [174, 207]. Elongationsfaktoren wie Paf1 und Spt5, deren Rolle für die Pol II Elongation gut charakterisiert ist, beeinflussen auch Pol I. Die Deletion dieser Faktoren führt in Hefe zu einer verminderten rRNA Produktion, ohne eine verringerten Pol I Dichte oder Anzahl aktiver rRNA Gen zu verursachen [208, 209].

1.3.5 Verteilung transkribierender RNA-Polymerasen auf Genen

RNA-Polymerasen sind auf der Länge eines Gens nicht gleichmäßig verteilt. Die Minderheit von Genen besitzt eine gleichmäßige Anordnung von Polymerasen über ihre gesamte Länge [210]. Die Elongation und damit die Postinitiationsschritte sind wahrscheinlich entscheidender für die Transkription eines Gens als die Transkriptionsinitiation [211, 212].

Die Ergebnisse der meisten Polymerasestudien wurden mittels Chromatinimmunpräzipitation (ChIP) gewonnen. ChIP-Experimente weisen gebundene Polymerase nach, nicht jedoch den Aktivitätszustand der Polymerase. Transkribierende Polymerasen können hingegen mittels nukleärer Transkriptionsmethoden durch Markierung neu generierter RNA nachgewiesen werden (nukleärer Run-on). Die bis dato neueste Methode ist die globale Run-on Sequenzierung (GRO-seq), bei der die Polymerasen mit hoher Auflösung lokalisiert werden und deren Aktivität quantifiziert wird [213]. Die Autoren konnten zeigen, dass 45% aller humanen Gene über ihre gesamte Länge durchgehend von Polymerasen transkribiert werden. 30% der untersuchten humanen Gene zeigen ein Muster, bei dem die Polymerase kurz nach dem Transkriptionsstart vorübergehend anhält (promotornahes Pausieren, *promoter proximal pausing*). An dieser Stelle ist die Konzentration der aktiven Polymerasen hoch. Ein vollständiges Transkript wird auch an diesen Genen produziert. ChIP-Experimente in eukaryoten Zellen zeigen, dass Pol I stärker mit den kodierenden als mit den nichtkodierenden Abschnitten der rDNA assoziiert ist. In geringerem Maße liegt aktive Pol I auch am Promotor vor [173, 190, 209, 214]. Eine umfassende ChIP-Analyse des rRNA Gens liegt bis heute nicht vor. Eine direkte Visualisierung der Pol I Verteilung liefern die elektronenmikroskopischen Aufnahmen von rDNA-Transkripten, die sogenannten *Miller spreads*. Sie zeigen auf der rDNA ungleichmäßig verteilte, transkribierende Polymerasen mit naszierender rRNA [215]. Andere Komponenten der Pol I Transkriptionsmaschinerie zeigen eine ähnlich heterogene Verteilung. ChIP von murinem UBF1 mit anschließender hochauflösender Sequenzierung der gebundenen DNA-Fragmente zeigen eine Anreicherung von UBF1 in den kodierenden rDNA-Abschnitten sowie im Promotorbereich, nicht aber in den intergenen Sequenzen [190, 216]

1.4 Fragestellung

Die Dynamik und Regulation der Transkription von rRNA durch die RNA-Polymerase I ist unvollständig untersucht. Eine genaue lokale Auflösung der Aktivität von Pol I auf der rDNA lag zum Zeitpunkt der experimentellen Durchführung dieser Doktorarbeit nicht vor. Die Verteilung von aktiver Pol I auf der rDNA in humanen Zellen könnte Hinweise auf die Regulation von rRNA Transkription und deren Verknüpfung mit anderen Teilprozessen der Ribosomenbiogenese geben.

Folgende Fragestellungen sollen beantwortet werden:

1. Wie sind transkribierende RNA-Polymerase I auf dem humanen rRNA-kodierenden rDNA-Abschnitt verteilt?
2. Welcher Teilschritt der Transkription könnte für die Pol I Aktivität entscheidend sein?
3. Sind andere Teilprozesse der Ribosomenbiogenese mit der Pol I Transkription gekoppelt?
4. Welche Modelle für eine Kopplung von Pol I Transkription und kotranskriptioneller Ribosomenbiogenese sind denkbar?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

1-kb-DNA Leiter	Invitrogen, Karlsruhe
[α - ³² P]-Cytidin 5'-Triphosphat	Hartmann-Analytik, Braunschweig
Agar	Invitrogen/Gibco, Karlsruhe
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
DNA-Oligonukleotide	Sigma-Aldrich, Hamburg
DME Medium	Invitrogen, Karlsruhe
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Carl Roth GmbH&CoKG, Karlsruhe
Ethanol p.A.	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Hamburg
Ethylendiamine-tetraacetic acid (EDTA)	Carl Roth GmbH&CoKG, Karlsruhe
Fötale Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories, Cölbe
Glycin	Carl Roth GmbH&CoKG, Karlsruhe
L-Glutamin 200 mM (100x)	Invitrogen, Karlsruhe
HCl	Merck KGaA, Darmstadt
Hygromycin B	Invitrogen, Karlsruhe
Isopropanol p.A.	Carl Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
NP40-10%-Lösung	Roche, Mannheim
Penicillin/Streptomycin 10.000 U/ml	Invitrogen, Karlsruhe
Proteinase K	Sigma, Taufkirchen
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Frankfurt
RNAse A	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
RNAasin <i>RNAse inhibitor</i>	Merck, Darmstadt
T7 RNA-Polymerase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Tris(hydroxymethyl)aminomethane	Merck KGaA, Darmstadt
Trypsin-EDTA	Gibco™/Invitrogen, Karlsruhe

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

6-Well Zellkulturplatten	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Blotting-Papier	Whatman, GE Healthcare, München
Glaswaren	Schott, Jena

Kryogefäße 1,5ml	Nunc, Wiesbaden
MinElute Gel-Extraktions-Kit	Qiagen, Hilden; Peqlab, Erlangen
Nylonmembranen Hybond™ N+	Amersham, GE Healthcare, München
Parafilm	Dynatech, Denkendorf
peqGOLD Total RNA Kit (S-Linie)	Peqlab, Erlangen
Pipettenspitzen, D 1000	Gilson, Wisconsin, USA
Pipettenspitzen, D 200	Gilson, Wisconsin, USA
Pipettenspitzen, D 10	Gilson, Wisconsin, USA
Pipettenspitzen gestopft, Art 1000	Molecular Bio-Products, San Diego
Pipettenspitzen gestopft, Art 200	Molecular Bio-Products, San Diego
Pipettenspitzen gestopft, Art 20	Molecular Bio-Products, San Diego
Pipettenspitzen gestopft, Art 10	Molecular Bio-Products, San Diego
Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Polypropylengefäße (15 ml; 50 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Reaktionsgefäße 2 ml	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
UV-Messküvette "Üvette"	Eppendorf, Hamburg
Zellkulturschale (Ø 10 cm)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturschale (Ø 15 cm)	Greiner Bio-One, Frickenhausen

2.1.3 Geräte

Bench-top Radioisotop-Detektor	Bioscan Washington D.C., USA
BioPhotometer 6131	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Biofuge 13	Heraeus Sepatech GmbH, Osterode
Bio-Rad PowerPac 300	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Eppendorf Zentrifuge 5417R	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Eppendorf Thermomixer 5436	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Flow-Hood-Sicherheitswerkbank	BDK GmbH, Sonnenbühl-Genkingen
Fuchs-Rosenthal-Zählkammer	GLW mbH, Würzburg
Gel Air Trocknungssystem	BioRad Laboratories, Hercules, CA
GS Gene Linker UV Kammer	BioRad Laboratories, Hercules, USA
Hypercassette	GE Healthcare, München
Inkubator für Zellkultur Heraeus 6000	Heraeus Sepatech GmbH, Osterode
Innova™ 4400 Schwenkinkubator	New Brunswick Scientific, Nürtingen
M23 Magnetrührer	GLW mbH, Würzburg
Megafuge 2.0	Heraeus Sepatech GmbH, Osterode

Mini-Sub Cell GT Elektrophorese- Zelle	Bio-Rad, München
Multi-Calimatic pH-Meter	Knick, Berlin
PCR Sytem Px2	ThermoHybaid
Slot-Blot System Whatman® Minifold® II	GE Healthcare, München
Speed Vac Konzentrationszentrifuge	Savant Instruments NC, Farmingdale,
SVC100H	N.Y. USA
Telaval 31 Lichtmikroskop	Carl Zeiss Jena GmbH, Göttingen
Vortexer Vortex Genie 2	Bender & Hobein GmbH, Ismaning
Wasserbad	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe

2.1.4 Puffer und Lösungen

2xTris/SDS pH 8,8	22,68 g Tris/Base 2,5 ml SDS 20% ad 250 ml H ₂ O pH-Einstellung mit HCl
Denhardtpuffer (1x)	200 mg BSA 200 mg Ficoll 400 200 mg Polyvinylpyrrolidon ad 1000 ml H ₂ O
DNA Ladepuffer 6x	0.03 % Bromphenolblau 0.03 % Xylencyanol 10 mM Tris/HCl pH 7.5 50 mM EDTA pH 8.0 30 % Glycerol
Lysepuffer	10 mM Tris/HCl, pH 7,5 10 mM MgCl ₂ 10 mM NaCl 0.5 % (v/v) Nonidet P-40
PBS (Phosphat-gepufferte Saline)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ *6H ₂ O 1,4 mM KH ₂ PO ₄

SSC Puffer (20x) pH 7	3 M NaCl 300 mM $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ pH-Einstellung mit HCl
TE Puffer 10x	100 mM Tris/HCl pH 8.0 10 mM EDTA
T7-RNA-Polymerasepuffer	10 μl 5xTranskriptionspuffer 25 mM NTPs RNase Inhibitor 1,25 μl 1,5 μg DNA-Templat 75 μCi [alpha -32P] CTP 1,5 μl T7-Polymerase (30 U) ad 50 μl H_2O
Transkriptionspuffer	10 mM Tris/HCl, pH 8.0 150 mM KCl 5 mM MgCl_2 0.5 mM NTPs 0,625 μM /100 μCi [alpha -32P] CTP

2.1.5 Sequenz der DNA-Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz 5'-3'
1	TGTCTCCAGAGCGGGAGCCGGAAGCATTTTCGGCCGGCCCCCTCCTACGAC
2	GGGCCGGGGAGCCCTCCCGGCCGCCCTGGCCACACGCAGGGGGCCGGCCCCG
3	GCGCCCGGGGTCCCTCTGGTCAACCCAAGGACACACGCGGGGACAGCGCC
4	GGACACGGACACCTGTCCCCAAAAACGCCACCATCGCAGCCACACACGGA
5	CGGGAGGTCGCGTCACCGACCACGCCGCCGGGCCAGGCGACGCGCGACAC
6	ATAACCCGGCGGCCCAAATTTGCCGACTCGGAGCGAAAGATATACCTCCC
7	CGGAGGCCCAACCTCTCCGACGACAGGTCGCCAGAGGACAGCGTGTGACG
8	GAGCGCGGCCGGCTAGCCGGTCACCGTGAGGCCAGAGCCCCGCGCGCATC
9	CGCGCGAGAGAACAGCAGGCCCGCGGGCCGCGGCAGGCGGCTCAAGGCAG
10	TGGGTCAGAGACCCGGACCCGGGCCGCCACCGGGAGTCGGGACGCTCGGA
11	AGAGCGCACGGGGCACGGTGGCCCTCGCCGCCTTCCCCGCCGCCCGGGG
12	GCACGGAGCCAGCGGGTGGGGTTGTGCGGCGCCCCGGGCGCCCCGACGCG
13	GGAAGGGGCGGCGGACAACCCCGCGGAGACGAGAAGCCTGACACGCACG
14	GAGGCCGGCCGGCCAGCGAGCCGATCGGCTCCGGCCACCCCCACTCCGG
15	CCCGGGAGAGCACGACGTCAACACATCGATCGAAGAGCCCCCGGGAGCG
16	TCCCGTTCGCCACGAACGTCCGCCCTCGCCCGTCGCGGCTCGGACCCGG
17	GTCTCGTCTCGTCTCACTCAAACCGCCTCGAACCCACACCGACGAGCTC
18	CGAGGGACGCCTGGGGAAGGGAGGGGGCCCTGCGGTACGAGGAAACACCT
19	AAGCGGAGGAGGGTCTCTGCGAGCGGGTCGCTACGGCAGCGCTACCATA
20	ACCGTCGCTCGTGATTCTCGTCCATCCTCCGACCCGGTCCCGCTCCGGGA
21	GCCACCAACGGACGTGAAGCCGGTGAGCCGCTCGGGGGGAAGAAGAGGAT
22	AAGACGAGAGACCACGGGCGAGGCCGGGGCGACGGGGAAGGCGCGAGAAA
23	CGGACGGACGGACGGGCCGCGGACGGGCGGACGGGAGGGAGCGAGCGGGC
24	GGGCCTCGCGAGGACGGGCCCGGCGCCCCGCAAGCGAGGAGGACGACGGA
25	GGTAAGGTAGAGCGCGGCGAGCCCCGACGCGGCCGGACGGCCGGCCGGG
26	TGGCTTAATCTTTGAGACAAGCATATGCTACTGGCAGGATCAACCAGGTA
27	TCTGATAAATGCACGCATCCCCCCCCGGAAGGGGGTCAGCGCCCGTCGGC
28	CAGGGCCTCGAAAGAGTCCTGTATTGTTATTTTTTCGTCACTACCTCCCCG
29	TTAATCATGGCCTCAGTTCCGAAAACCAACAAAATAGAACC GCGGTCCTA
30	ATCTGTCAATCCTGTCCGTGTCCGGGCCGGGTGAGGTTTCCCGTGTGTAG
31	TCAAGTTCGACCGTCTTCTCAGCGCTCCGCCAGGGCCGTGGGCCGACCCC
32	CCGCCGCGGGCCTCGCCCTCCGGGCTCCGTTAATGATCCTTCCGCAGGTT
33	TCGCGGTGGGGGGGTGGGTGTGCGGAGGGAAGCGCGCGGCGGCGGCGCG
34	GCTCTCGCGGCGGCGGGGCCGGCGGCGAACGAACGAGCGAGCGAACGAA
35	CGGGCGGACGGGCGATCCCCCAAGGGGTCTTTAAACCTCCGCGCCGGAA
36	TACGAGGTTCGATTGGCGAGGGCGCTCCCGACGACGCACCGGGAGGAGGC
37	GCTGCGTTCTTCATCGACGCACGAGCCGAGTGATCCACCGCTAAGAGTCG
38	CCCGGGGCGATTGATCGGCAAGCGACGCTCAGACAGGCGTAGCCCCGGGA
39	CGGCCACGGGAACTCGGCCCCGAGCCGGCTCTCTTTCCCTCTCCGTCTT
40	GCCCCGACCGCCCGCCCGACGCTCCGTGCGGAGACGGGCCCGGCGAGGGGG
41	TCTCGGAGGGGGACGGGCCGCTCGGCGGACGGACGGACGGAATCGCGCCG
42	GACTAATATGCTTAAATTCAGCGGGTCGCCACGTCTGATCTGAGGTGCGG
43	CGGGGCGGGGATTCGGCGCTGGGCTCTTCCCTGTTCACTCGCCGTTACTG

44	CCGTGTTTCAAGACGGGTCTGGGTGGGTAGCCGACGTCGCCGCCGACCCCG
45	TAGTTCACCATCTTTCGGGTCTTAACACGTGCGCTCGTGCTCCACCTCCC
46	GCTCGCCCATCTCTCAGGACCGACTGACCCATGTTCAACTGCTGTTTACA
47	GACAAACCCTTGTGTCTGAGGGCTGACTTTCAATAGATCGCAGCGAGGGAG
48	CGGCGCCGAACGCGCACGCCCCGCCGGGCCCCCGCACGCGCGCGCGCG
49	CGCGGTCTGGCGGGAGAGGCCGGGAGGGAGGAAGACGAACGGAAGGACGGA
50	CATGGAGCGGTGAGGGAGGAAGGGGACACCGCCTAGCCAGCCAGATCAGC

2.1.6 Sequenz und Annotation des synthetischen DNA-Abschnitts für die Herstellung eines *in vitro* Transkriptionssystems

Sequenz des synthetischen Abschnitts

5'

GTCGTAGGAGGGGCCGCGGAAATGCTTCCGGCTCCCGCTCTGGAGACACGGGCGCGCCCTGCGTG
TGGCCAGGGCGGCGGGAGGGCTCCCCGGCCCGGCGCTGTCCCCGCGTGTGTCCTTGGGTTGACCAGA
GGGACCCCGGGCGCTCCGTGTGTGGCTGCGATGGTGGCGTTTTTGGGGACAGGTGTCCGTGTCCGTGT
CGCGCGTCGCTGGGCCGGCGGGCTGGTTCGGTGACGCGACCTCCCGGCCCGGGGAGGTATATCTTT
CGCTCCGAGTCGGCAATTTTGGGCCGCCGGGTATTGCTGACACGCTGTCTCTGGCGACCTGTCTGTC
GGAGAGGTTGGGCTCCGGATGCGCGCGGGGCTCTGGCCTCACGGTGACCGGCTAGCCGGCCGCGCTC
CTGCCTTGAGCCGCTGCCGCGGCCCGCGGGCTGCTGTTCTCTCGCGCGTCCGAGCGTCCCGACTCC
CGGTGCCGGCCCGGGTCCGGGTCTCTGACCCACCCGGGGCGGCGGGGAAGGCGGCGAGGGCCACCGT
GCCCCGTGCGCTCTCCGCTGCGGGCGCCCGGGGCGCCGACAACCCACCCGCTGGCTCCGTGCCGTG
CGTGTGAGGCGTTCTCGTCTCCGCGGGGTTGTCCGCCGCCCTTCCCCGGAGTGGGGGGTGGCCGGAG
CCGATCGGCTCGCTGGCCGGCCGGCTCCGCTCCCGGGGGGCTCTTCGATCGATGTGGTGACGTCTGT
CTCTCCCGGGCCGGGTCCGAGCCGCGACGGGCGAGGGGCGGACGTTTCGTGGCGAACGGGAATAGAGCT
CGTCGGTGTGGGGTTCGAGGCGGTTTGAGTGAGACGAGACGAGACATAAGGTGTTTCTCTGACCGCA
GGGCCCCCTCCCTTCCCAGGCGTCCCTCGAAATATGGTAGCGTGCCGTAGCGACCCGCTCGCAGAG
GACCTCCTCCGCTTATATCCCGAGCGGGACCGGTTCGAGGATGGACGAGAATCACGAGCGACGGT
TTAATCCTCTTCTTCCCCCGAGCGGCTCACCGGCTTACGTCCGTTGGTGGCTTATTTCTCGCGCT
TCCCCGTGCCCCGGCCTCGCCGTGGTCTCTCGTCTTAAAGCCCGCTCGTCCCTCCCGTCCGCCCG
TCCGCGGCCCGTCCGTCCGTCCGTCCGTCTCTCTCGCTTGGGGGCGCCGGGCCCCGTCTCTCGCA
GGCCCCCGGCCGGCCGTCCGGCCGCGTCCGGGGCTCGCCGCGCTCTACCTTACCTACCTGGTTGATC
CTGCCAGTAGCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAGCCACATGCCGACGGGCGCTGACCCCTTTCGCGGG
GGGGATGCGTGCAATTTATCAGATTTTCGGGGAGGTAGTGACGAAAAATAACAATACAGGACTCTTTCA
GGCCCTGGAATAGGACCGCGGTTCTATTTTGTGTTTTTCGGAAGTGGGCGCATGATTAATGACTCAA
CACGGGAAACCTCACCCGGCCCGGACACGGACAGGATTGACAGATTTAGGGGTGCGCCACGGCCCTG
GCGGAGCGCTGAGAAGACGGTCAACTTGATATAACCTGCGGAAGGATCATTAACGGAGCCCGGAGGG
CGAGGCCCGCGGCGGCCGCCGCCGCCGCGCGCTTCCCTCCGCACACCCACCCCCCACCAGCGATAT
TTCGTTGCTCGCTCGTTCGTTTCGCCGCCCGGCCCGGCCGCCGCGAGAGCTAATTCCGGCGCGGAGGT
TTAAAGACCCCTTGGGGGATCGCCCGTCCGCCGAAAGCCTCCTCCCGGTGCGTCTCGGGAGCGCC
CTCGCCAAATCGACCTCGTACGACTCTTAGCGGTGGATCACTCGGCTCGTGCGTCGATGAAGAACGCA
GCTAATCCCGGGGCTACGCTGTCTGAGCGTCTGTCGATCAATCGCCCCGGAATAAGACGGAGA
GGGAAAGAGAGACCGGCTCGGGCCGAGTTCCCGTGGCCGTCTCCCCCTCGCCGGGCCCCGTCTCCCGA
CGGAGCGTCTGGGCGGGCGGTCTGGGCCGGCGCGATTCCGTCCGTCCGTCCGCCGAGCGGCCCGTCCCC
TCCGAGACGCGACCTCAGATCAGACGTGGCGACCCGCTGAATTTAAGCATATTAGTCAATCAGTAACG
GCGAGTGAACAGGGAAGAGCCCAGCGCCGAATCCCCGCCCGTTACGGGGTCTGGCGGCGACGTCGGCT
ACCCACCCGACCCGTCTTGAAACACGGTATGGGAGGTGGAGCACGAGCGCACGTGTTAGGACCCGAAA
GATGGTGAACATACCATGTGAACAGCAGTTGAACATGGGTGAGTCGGTCTCTGAGAGATGGGCGAGCTAT
CTCCCTCGCTGCGATCTATTGAAAGTCAGCCCTCGACACAAGGGTTTTGTCCGCGCGCGCTGCGTGCG
GGGGGCCCGGGCGGTGCGCGTTCGGCGCCGTCCGTCTTCCGTTTCGTCTTCTCCCTCCCGGCCCTC
TCCCGCCGACCGCGATACGATATC

3'

Annotation des synthetischen Abschnitts

Position DNA-Plasmid	Korrespondierende Position der rDNA (GenBank #U13369)	DNA-Oligonukleotid
1-50	42691-42740	1
51-100	42741-42790	2
101-150	42791-42840	3
151-200	42841-42890	4
201-250	42891-42940	5
251-257	42941-42947	
258-307	42948-42997	6
309-358	1-50	7
359-408	51-100	8
409-458	101-150	9
459-508	151-200	10
509-558	201-250	11
559-608	251-300	12
609-658	301-350	13
659-708	351-400	14
709-758	401-450	15
759-808	451-500	16
809-811	spacer	
812-861	929-978	17
862-864	spacer	
865-914	1287-1336	18
915-917	spacer	
918-967	1483-1532	19
968-970	spacer	
971-1020	1884-1933	20
1021-1023	spacer	
1024-1073	2232-2281	21
1074-1076	spacer	
1077-1126	2654-2703	22
1127-1129	spacer	
1130-1179	3507-3556	23
1180-1229	3557-3606	24
1230-1279	3607-3656	25
1280-1329	3657-3706	26
1330-1332	spacer	
1333-1382	3833-3882	27
1383-1385	spacer	
1386-1435	4159-4208	28
1436-1438	spacer	
1439-1488	4527-4576	29
1489-1491	spacer	
1492-1541	4952-4903	30
1542-1544	spacer	
1545-1594	5415-5464	31
1595-1597	spacer	
1598-1647	5508-5557	32
1648-1697	5558-5607	33
1698-1700	spacer	
1701-1750	5642-5691	34
1751-1753	spacer	

1754-1803	6133-6182	35
1804-1806	spacer	
1807-1856	6573-6622	36
1867-1906	6623-6672	37
1907-1909	spacer	
1910-1959	6749-6798	38
1960-1962	spacer	
1963-2012	7027-7076	39
2013-2015	spacer	
2016-2065	7835-7884	40
2066-2115	7885-7934	41
2116-2165	7935-7984	42
2166-2168	spacer	
2169-2218	8017-8066	43
2219-2221	spacer	
2222-2271	9201-9250	44
2272-2274	spacer	
2275-2324	9458-9409	45
2325-2327	spacer	
2328-2377	10383-10334	46
2378-2380	spacer	
2381-2430	12920-12969	47
2431-2480	12970-13019	48
2481-2530	13020-13069	49
2531-2540	Eco RV Schnittstelle	

2.1.6 Software

Endnote® X4	Thomson, USA
GIMP	GIMP Team
MacVector® 9.0	Oxford Molecular Group, UK
Office 2007® für Windows®	Microsoft Cooperation, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung humaner Zellen

Die humanen adhärenenten Zelllinien U2OS (Osteosarkom) und H1299 (Adenokarzinom der Lunge) wurden bei 37°C und 8% CO₂ Partialdruck in einem Zellinkubator kultiviert. Als Zellmedium wurde mit FCS (10% final), Penicillin (100U/ml), Streptomycin (100 µg/ml) und L-Glutamin (2mM) supplementiertes DME-Medium verwendet. Die Expansion der Zellen erfolgte bis zu einer Konfluenz von etwa 90% der Gesamtfläche der Kulturschalen. Bei Erreichen dieses Wertes wurden die Zellen einmalig mit PBS-Puffer gewaschen und für 5 Minuten mit Trypsin/EDTA bei 37°C enzymatisch behandelt. Durch Zugabe von frischem Zellmedium wurde die Reaktion gestoppt und die Zellen im Verhältnis von 1:10 auf neue Kulturschalen aufgetragen.

2.2.2 Lebendzellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl resuspendierter Zellen wurde eine Fuchs-Rosenthal-Zählkammer verwendet. 50 µl der Zellsuspension wurden mit dem gleichen Volumen einer 0,5%iger Trypanblaulösung (w/v in PBS) versetzt. Tote Zellen nehmen über ihre nicht intakte Membran den Farbstoff auf und färben sich blau. Die trypanblau-positiven Zellen wurden von der Zählung ausgeschlossen. Die Zahl der lebenden Zellen wurde mit dem Faktor der Zählkammer (10^4 für eine Konzentration von n/ml) multipliziert, um die Konzentration der Zellen in der Suspension zu erhalten.

2.2.3 Kryokonservierung humaner Zelllinien

Abzentrifugierte Zellen einer durch Trypsinbehandlung hergestellten Zellsuspension werden in 1 ml Kryokonservierungsmedium (anteilig 20% DMSO, 40% FCS, 40% DMEM) resuspendiert und in ein Kryokonservierungsröhrchen pipettiert. Anschließend erfolgt das langsame Einfrieren auf zunächst -80°C in einer Box mit Isopropanol für 24 Stunden. Danach kann das Kryokonservierungsröhrchen in die Dampfphase von flüssigem Stickstoff überführt werden.

Um die kryokonservierten Zellen zu rekultivieren werden die Kryokonservierungsröhrchen dem Stickstofftank entnommen und bei 37°C im Wasserbad zügig aufgetaut. Anschließend erfolgt eine vorsichtige Resuspension in DME-Medium und zweimaliges Waschen mit PBS-Puffer zum Entfernen des DMSO. Die Zellen werden für mindestens drei Tage mit supplementiertem DME-Medium inkubiert, bevor die eigentlichen Experimente begonnen werden.

2.2.4 Restriktionsverdau mit Endonuklease EcoRV

Der Reaktionsansatz für den Restriktionsverdau bei 37°C setzt sich wie folgt zusammen:

DNA	2 µg
Restriktionsenzym puffer	2 µl
Restriktionsenzym	10 U
Add ddH ₂ O	20 µl

2.2.5 DNA- und RNA-Gelelektrophorese

Ein Agarosegel von 1% (w/v) wurde durch Lösung und Erhitzen von 1g Agarose in 0,5x TAE-Puffer hergestellt. Die Lösung wurde abgekühlt, Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) dazugegeben und in die vorgefertigten Gelkammern gegossen. In die Taschen des durch Abkühlen entstandenen Gels wird anschließend die mit einem Ladepuffer versetzten Nukleinsäuren pipettiert. Die Auftrennung erfolgte in einem elektrischen Feld bei ca. 5V pro Zentimeter

zwischen den Elektroden. Nach Auftrennung wurden die mit Ethidiumbromid versetzten Nukleinsäuren durch UV-Licht visualisiert und dokumentiert.

2.2.6 RNA-Geltrocknung

Das Agarose-Gel mit elektrophoretisch aufgetrennter RNA wurde mittels Gelrockner eingedampft. Das Gel wird auf ein Whatman-Blottingpapier aufgelegt und luftblasenfrei mit Saran-Folie bedeckt. Der Trockner ist an eine Pumpe angeschlossen, die das Gel in einem Vakuum hält. Durch den Deckel des Trockners erfolgt das Aufheizen auf 80°C für drei Stunden. Anschließend liegt das getrocknete Gel und damit die aufgetrennte RNA als dünner Film auf dem Blottingpapier vor.

2.2.7 Detektion radioaktiv markierter RNA mittels Autoradiographie

Das Blottingpapier mit getrocknetem Gel wird in eine saubere Expositionskassette eingeklebt. Darauf wird ein radiosensitiver Film (Biomax, Kodak) gelegt und für 2-3 Tage bei -80°C exponiert. Der entwickelte Film wird eingescannt und die Ergebnisse mit GIMP Image Software analysiert.

2.2.8 Immobilisierung von DNA-Oligonukleotiden auf nukleinsäurebindenden Nylonmembranen

Je genauer und räumlich auflösender man die Verteilung transkribierender RNA-Polymerasen detektieren möchte, desto höher ist die Anzahl der verwendeten DNA-Oligonukleotide. Insgesamt wurden 50 Oligos verwendet. Zum Immobilisieren der Oligos auf einer nukleinsäurebindenden Nylonmembran wurde das Slot-Blot-System Whatman® Minifold® II verwendet (Abb. 2). In drei Reihen sind jeweils 24 schlitzförmige Vertiefungen angeordnet. Das System besteht aus mehreren Platten und Kunststofflamellen und wird wie unten abgebildet zusammengefügt (Abb. 2). Die Nylonmembran und das Blottingpapier werden vorher mit doppeldestilliertem Wasser angefeuchtet. In die Schlitzvertiefungen wird jeweils 150 pmol des in 300 µl SSC-Puffer (10x) gelösten Oligos pipettiert. Mittels einer Absaugvorrichtung wird die Lösung vollständig durch die Membran und das Blottingpapier gezogen. Die Oligos binden an die Oberseite der Nylonmembran. Nach 2-5 Minuten ist die Lösung abgesaugt, das System wird auseinandergebaut und die Membran vorsichtig getrocknet. Durch zweiminütige UV-Behandlung werden die Oligos auf der Membran vollständig immobilisiert. Anschließend wird die Membran zwischen zwei Blottingpapieren liegend bei 80°C für eine Stunde inkubiert.

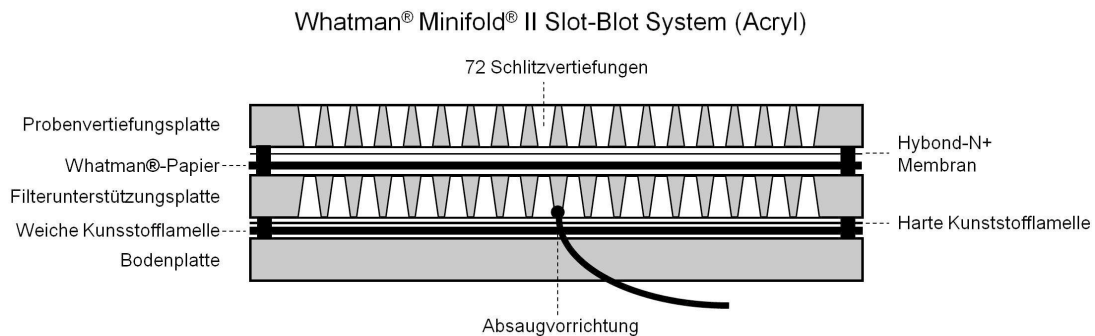


Abb. 2: Aufbau eines Slot-Blot Systems zur Immobilisierung von DNA-Oligonukleotiden auf Nylonmembranen (Seitansicht)

Um eine möglichst große Anzahl von DNA-Oligonukleotiden manuell auf eine ribonukleinsäurebindende Nylonmembran zu immobilisieren wurde ein sogenanntes Slot-Blot System verwendet. Die Hybond-N+ Membran und das Whatman®-Blottingpapier werden kurz mit doppelt destilliertem Wasser angefeuchtet und dann mit den einzelnen Komponenten übereinander geschichtet. Die Konstruktion wird von zwei Kunststoffleisten seitlich zusammengehalten und aneinander gepresst. 150 pmol jedes DNA-Oligonukleotides werden in 300 µl SSC-Puffer (10x) gelöst und luftblasenfrei in eine der Schlitzvertiefungen gegeben. Anschließend wird durch Anlegen der Absaugvorrichtung die Flüssigkeit durch die Membran und das Blottingpapier gezogen. DNA-Oligonukleotide bleiben zurück und binden an die Oberseite der Membran.

2.2.9 Herstellung eines *in vitro* Transkriptionssystems und T7-RNA-Polymerasereaktion

Für die Herstellung des *in vitro* Transkriptionssystems wurde ein synthetisches Gen mit aufeinanderfolgenden Zielsequenzen der rDNA hergestellt. Am 3'-Ende der synthetischen Sequenz wurde zur Linearisierung des Plasmids eine Schnittstelle für die EcoRV-Restriktionsendonuklease angefügt. Die Synthese des Fragments von 2556 Basen Länge wurde von der Fa. Geneart, Regensburg, durchgeführt. An die Enden des Fragments wurden Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen AscI und PacI angehängt, damit die Sequenz in den Hilfsvektor pMK (kanR) kloniert werden kann. Die T7-RNA-Polymerasepromotorsequenz 5'-TAATACGACTCACTATAGG-3' befindet sich proximal der Insertionsstelle der synthetisierten Sequenz im Hilfsvektor (Vektorposition 320-338).

Mittels EcoRV-Verdau wird der Plasmid linearisiert, so dass eine T7-RNA-Polymerasetranskription durchgeführt werden kann. Ein 50 µl Ansatz des Reaktionspuffers mit 75 µCi [α -³²P]-CTP und 1,5 µg des linearisierten Plasmids wurde für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Die generierte RNA wurde isoliert und 10% der Gesamtmenge zur Darstellung auf ein Ethidiumbromid-Agarose-Gel aufgetragen. Die restlichen 90% wurden zur Hybridisierung an immobilisierte DNA-Oligonukleotide verwendet. Die Hybridisierungsmethodik wird in Punkt 2.2.10 beschrieben. Die Intensitäten der Hybridisierung wurden mittels GIMP Image Software quantitativ erfasst.

2.2.10 Nukleärer Run-on

Das Protokoll orientiert sich an Nukleären Run-ons, die mit Zellen ins Suspensionskultur durchgeführt wurden [217]. Für die Verwendung mit adhärenenten Zellen wurden einige Modifikationen eingeführt. Zunächst werden zwischen sechs und acht Millionen Zellen in 10 cm-Kulturschalen ausplattiert und für mindestens 24 Stunden kultiviert, um eine vollständige Adhärenz zu gewährleisten. Nach 24 Stunden werden die Zellen zweimal mit PBS-Puffer (4°C) gewaschen und anschließend für 20 Minuten mit einem Nonidet P40-haltigen Zelllysepuffer auf Eis inkubiert. Durch das nicht-ionische Detergenz Nonidet P40 bleibt die Kernmembran intakt. Der Lysepuffer wird entfernt und die Zellen werden einmal mit PBS-Puffer (4°C) gewaschen. In eine 10 cm-Kulturschale wird durch Zugabe von zwei Milliliter des vorgewärmten [α -³²P]-CTP-haltigen Transkriptionspuffers (30°C) die Transkription gestartet und für 60 Minuten bei 30°C fortgesetzt. Die Reaktion wird durch Zugabe des Lysepuffers eines RNA-Isolationskits beendet und die zelluläre RNA laut Protokoll des Kits mittels Säulenaufreinigung extrahiert. Das Eluat (50 μ l) wird für die Hybridisierung verwendet. Die für die Hybridisierung notwendigen Nylonmembranen mit immobilisierten DNA-Oligonukleotiden werden zweimal mit SSC-Puffer(2x) bei 58°C für zehn Minuten gewaschen. Anschließend erfolgt eine Prähybridisierung der Membran in fünf Milliliter Denhardtpuffer für drei Stunden bei 58°C in einem rotierenden Ofen. Die radioaktiv markierte zelluläre RNA wird auf 95°C für zwei Minuten hochgeheizt, um Sekundärstrukturen aufzulösen. Die RNA wird kurz auf Eis gelagert und anschließend innerhalb einer Glasröhre auf die Nylonmembran pipettiert. Die Hybridisierung in fünf Milliliter Denhardtpuffer dauert drei Tage an. Danach werden die Nylonmembranen mit jetzt hybridisierter RNA hintereinander mit 1% SDS/SSC(2x), 0,5% SDS/SSC(0,1x) und 1 mM EDTA/SSC(1x) bei 45°C für jeweils 30 Minuten gewaschen. Mittels RNase A-Verdau (2 μ g/ml) für 30 Minuten bei 30°C in 1 mM EDTA/SSC(1x) wird nicht hybridisierte RNA abgebaut. Der letzte Waschschrift wird mit 0,5% SDS/SSC(0,1x) bei 45°C für 30 Minuten durchgeführt. Die Membran wird vorsichtig getrocknet und das Hybridisierungssignal autoradiographisch erfasst.

2.2.11 Globale Run-on Sequenzierung (GRO-seq)

Die globale Run-on Sequenzierung wurde erstmals im Jahre 2008 publiziert [213]. Die Methode basiert auf dem Konzept, nukleäre, transkribierte RNA mittels spezifischer Markierung durch 5-Bromouridin-5'-Triphosphat (BrUTP) zu isolieren, anzureichern und durch moderne Sequenzierungstechnik die Transkriptionsaktivität auf einem Gen hochauflösend abzubilden. Wie bei konventionellen nukleären Run-ons werden zunächst Kerne von humane IMR90-Fibroblasten isoliert. In den Transkriptionspuffer wird BrUTP gegeben und die Reaktion für fünf Minuten bei 30°C durchgeführt. Die Run-on Länge

reduziert sich bei einer CTP-Konzentration von 1 μ M auf ca. 100 Nukleotide. Die RNA wird mit Phenol/Chloroform extrahiert und durch Basenhydrolyse mit 1 M NaOH auf die gewünschte Größe geschnitten. Mittels anti-deoxy-BrU-Beads wird die transkribierte RNA von der Gesamt-RNA isoliert und nach mehrfachen Waschschritten von den Beads eluiert. Am 5' und 3'-Ende der hydrolysierten RNA-Fragmente befindet sich eine 5-Methylguanosin-Kappe bzw. 3'-Phosphat. Diese müssen vor Ligation der Enden mit Adapteroligonukleotiden entfernt werden. Durch Zugabe von Tabaksäure-Pyrophosphatase, wird die 5'-Kappe entfernt. Die T4 Polynukleotidkinase katalysiert die Entfernung des 3'-Phosphates und fügt am 5'-Ende ein Phosphat an. Nach schrittweiser Ligation der Adapteroligonukleotide durch eine T4 RNA-Ligase an das 5'- und 3'-Ende der RNA und erneuter BrU-Bead-Aufreinigung sind die transkribierten RNA-Moleküle bereit für eine Reverse Transkriptase-Reaktion zur Herstellung einer cDNA-Bibliothek. Die cDNA wurde durch eine Polymerasekettenreaktion mit 15 Zyklen amplifiziert, die restliche RNA durch RNasen degradiert. Nach Aufreinigung und Extraktion der entstandenen cDNA-Bibliothek auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel erfolgt die Sequenzierung. Die ausgelesenen Daten wurden gegen das humane Genom verglichen.

3 Ergebnisse

3.1 Nukleärer Run-on als Methode zur Bestimmung der RNA-Polymerase-Konzentration

Die Verteilung von transkribierenden RNA-Polymerasen auf einem Gen kann mittels nukleärer Run-on Methode untersucht werden (Abb. 3). Dabei wird in die naszierende RNA ein mit radioaktivem ^{32}P Phosphat markiertes Nukleotid eingebaut. Der Einbau des einzelnen Nukleotids findet dementsprechend am Standort der transkribierenden Polymerase statt. Daher kann man von der Sequenz der radioaktiven RNA auf die DNA-Position der Polymerase zum Zeitpunkt der Nukleotidinkorporation schließen. Während der Reaktion transkribieren die Polymerasen entlang der DNA und rücken damit eine bestimmte Anzahl von Nukleotiden vor. Zu einem gewählten Zeitpunkt wird die Reaktion durch Lyse der Kerne beendet. Die RNA wird isoliert und an synthetische DNA-Oligonukleotide (Oligos) von 50 Nukleotiden Länge hybridisiert. Die DNA-Oligonukleotide sind revers-komplementär zur RNA und entsprechen dem jeweiligen Sequenzabschnitt auf der transkribierten DNA. Nichthybridisierte Einzelstrang-RNA wird mittels RNasen verdaut. Nur an die DNA-Oligonukleotide hybridisierte, radioaktiv markierte RNA bleibt nach dem RNase-Verdau intakt. Nach mehreren Waschschritten wird mittels Autoradiographie die Signalintensität der inkorporierten radioaktiven Nukleotide gemessen. Aus einer erhöhten Signalintensität an einer bestimmten DNA-Position kann man auf eine erhöhte Anzahl von aktiven Polymerasen und damit auf erhöhte Transkriptionsaktivität schließen.

Prinzip des nukleären Run-on: Messung von Transkriptionsraten und Polymerasedichte

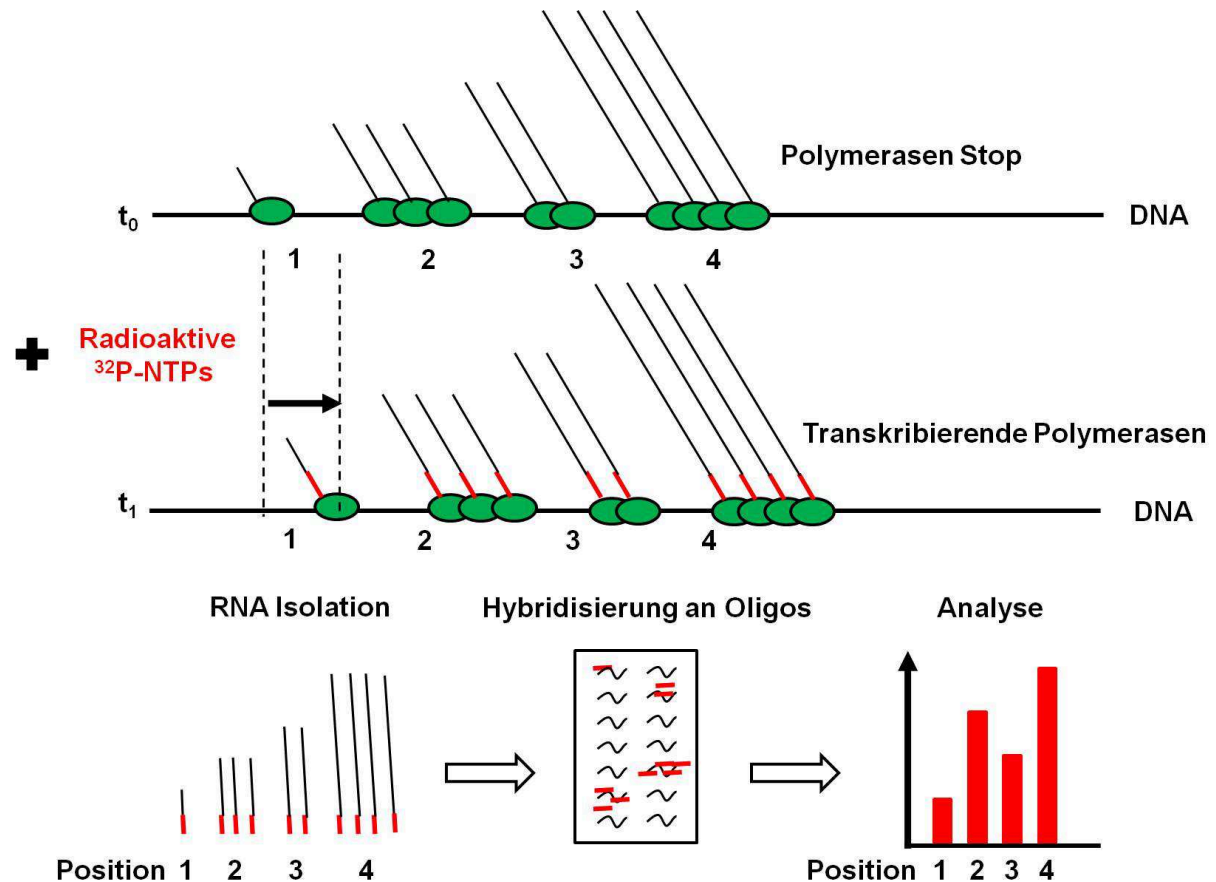


Abb. 3: Prinzip der nukleären Run-on Methode

Mittels nukleärer Run-on Methode erfasst man die Verteilung transkribierender RNA-Polymerasen auf einem Gen und daraus folgend die Transkriptionsrate eines Gens. Intakte Zellkerne werden aus lysierten Zellen isoliert. Durch Absenken der Temperatur wird die Transkriptionsaktivität der RNA-Polymerasen (grün) zunächst erniedrigt. Zu diesem Zeitpunkt t_0 befinden sich die Polymerasen an bestimmten Positionen des Gens. Dann wird die Transkriptionsreaktion durch Zugabe eines Transkriptionspuffers, der ein radioaktiv markiertes ^{32}P -NTP enthält, und Erhöhung der Temperatur wieder fortgesetzt. Nach einer bestimmten Zeit wird die Reaktion gestoppt, die radioaktiv markierte RNA (rot) isoliert und an immobilisierte komplementäre DNA-Oligonukleotide hybridisiert. Abhängig von der Anzahl aktiver Polymerasen an bestimmten Genabschnitten fällt die Menge an radioaktiv markierter RNA unterschiedlich aus. Nach der Hybridisierung kann die Signalintensität mittels Autoradiographie gemessen werden. Daraus ergibt sich ein Bild der Verteilung aktiver Polymerasen auf den untersuchten DNA-Sequenzen.

Für unsere Fragestellung untersuchten wir mittels nukleärem Run-on die Verteilung der RNA-Polymerase I auf der rDNA (Abb. 4). Der 18S-, 5.8S- und 28S-rDNA-Cluster wird ausschließlich von Pol I transkribiert, so dass einzig die Transkriptionsaktivität dieser RNA-Polymerase gemessen wird. Als radioaktiv markiertes Nukleotid wurde ^{32}P -Phosphat-CTP verwendet und zum Reaktionspuffer gegeben. Die eingesetzten 49 DNA-Oligos decken verschiedene Abschnitte der rDNA mit unterschiedlicher Auflösung ab (Abb. 5). Das Areal unmittelbar vor und nach Transkriptionsstart wurde von Nukleotidposition -308 bis +500 mittels 16 Oligos nahezu lückenlos abgebildet. Im Falle einer starken Pol I Aktivität im

Promotor-nahen Bereich wäre eine Transkriptionsregulation über die Transkriptionsinitiation wie bei der RNA-Polymerase II auf proteinkodierenden Genen denkbar. Es wird zudem angenommen, dass die naszierende rRNA kotranskriptioneller Basenmodifikation und Prozessierung unterliegt. Daher haben wir die Übergänge zwischen einzelnen definierten rRNA-Abschnitten in stärkerer Auflösung abgebildet (Abb. 5).

Nukleärer Run-on

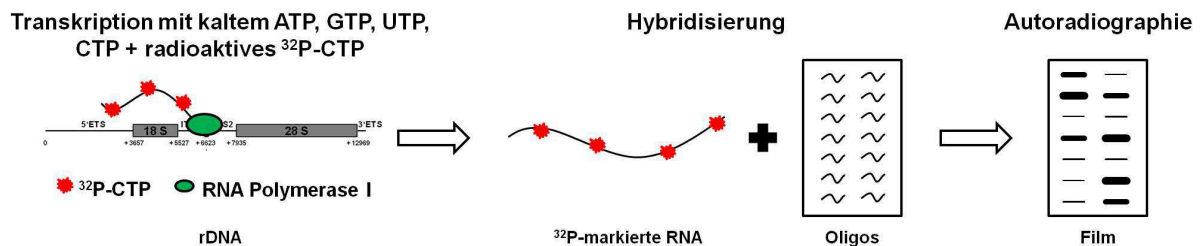


Abb. 4: Nukleärer Run-on von rDNA

Für einen nukleären Run-on der rDNA werden die Ribonukleotide ATP, GTP, UTP, CTP sowie radioaktiv markiertes CTP im Reaktionspuffer verwendet. Die Ribonukleotide werden in die produzierte rRNA inkorporiert, so dass mit ^{32}P -CTP radioaktiv markierte Transkripte entstehen. Die markierte rRNA wird an synthetische DNA-Oligonukleotide hybridisiert, die revers-komplementär zu bestimmten Abschnitten der rDNA sind. Das Hybridisierungssignal wird mittels Autoradiographie bestimmt.

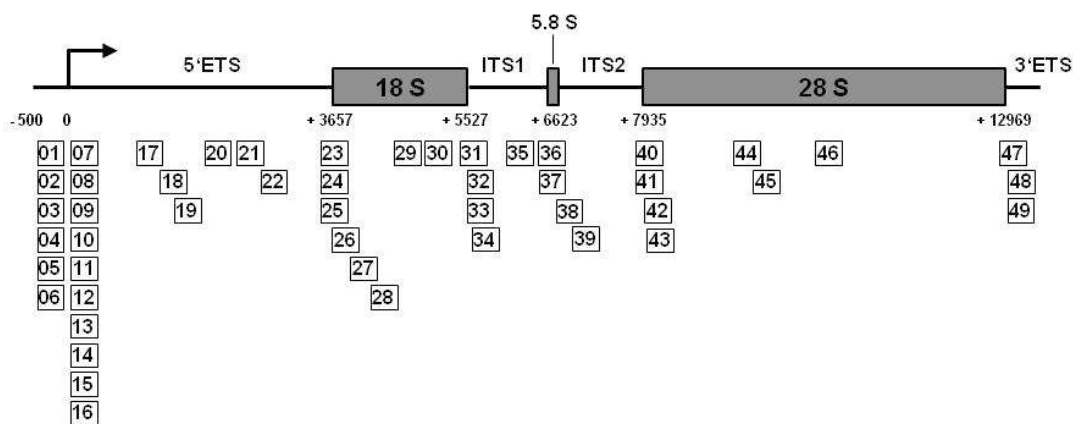


Abb. 5: Korrespondierende Position der revers-komplementären DNA-Oligonukleotide zur rDNA

Die eingesetzten synthetischen DNA-Oligonukleotide von 50 Nukleotiden Länge sind revers-komplementär zum kodierenden rDNA-Strang und können damit die produzierte RNA binden. Die für die strukturelle rRNA codierenden Abschnitte sind grau unterlegt (18S, 5.8S, 28S). Der Promotorbereich im 5'-Bereich, der Transkriptionsstart (Pfeil) und die ersten 500 Basen wurden mittels Oligos komplett abgedeckt. Die Übergänge zwischen den einzelnen Teilabschnitten wurden ebenso ohne Unterbrechung dargestellt. Zusätzlich wurden einzelne Oligos für die 5'-ETS, ITS1, ITS2 und 3'-ETS-Abschnitte verwendet.

3.2 Herstellung eines *in vitro* Transkriptionssystems zur Normalisierung der Hybridisierungsstärke von DNA-Oligonukleotiden mit variablem GC-Gehalt

DNA-Oligonukleotide mit einem homogenen GC-Gehalt sind für eine vergleichbare Hybridisierungsstärke von RNA an DNA nötig, um Aussagen über die Verteilung der Pol I treffen zu können. Aufgrund der heterogenen Sequenz der rDNA hinsichtlich des GC-Gehaltes ergeben sich unterschiedliche Hybridisierungstemperaturen. Oligos mit hohem GC-Gehalt haben eine höhere Schmelztemperatur, hybridisieren also im Vergleich zu GC-armen Oligos erst bei höheren Temperaturen mit ausreichender Spezifität an die korrespondierende RNA. Aus praktischen Gründen ist es schwierig, für 49 verschiedene Oligos mit heterogenem GC-Gehalt individuelle Hybridisierungsschritte mit unterschiedlichen Temperaturen durchzuführen (Abb. 6).

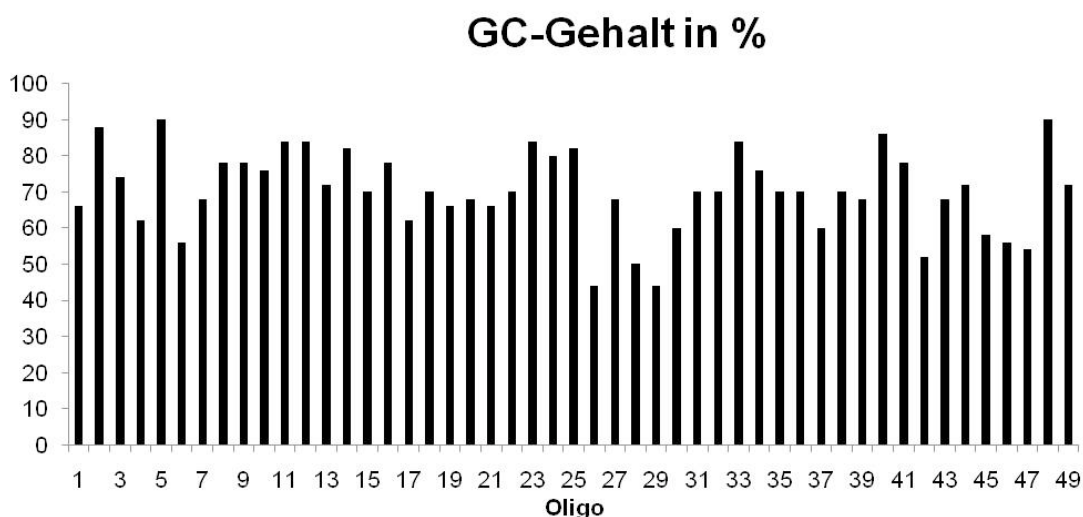


Abb. 6: GC-Gehalt der eingesetzten DNA-Oligonukleotide

Die für die nukleären Run-on Experimente genutzten DNA-Oligonukleotide weisen einen heterogenen GC-Gehalt auf. Den niedrigsten GC-Gehalt besitzt Oligo #26 und #29 mit 44%, den höchsten GC-Gehalt besitzen Oligo #5 und #48 mit 90%.

Daher wurde eine Hybridisierungstemperatur für alle Oligos festgelegt (58°C) und die Dauer der Hybridisierung im Denhardt-Puffer auf 3 Tage ausgedehnt. Um die einzelnen Signalintensitäten der Hybridisierung vergleichen zu können, wurde ein Standardisierungsansatz durch Anwendung eines *in vitro* Transkriptionssystems verfolgt (Abb. 7). Von einem synthetisch generierten DNA-Templat wird dabei eine RNA transkribiert, die revers-komplementär an die eingesetzten Oligos binden kann. Die Sequenz der *in vitro* transkribierten RNA entspricht hintereinander geschalteten rRNA-Abschnitten, an die die Oligos im nukleären Run-on hybridisieren. Die Hybridisierungsintensität der Oligos an ihre jeweilige revers-komplementäre RNA bei 58°C wird dann mittels Autoradiographie gemessen. Die individuelle Hybridisierungsintensität der Oligos kann dann verglichen

werden und daraus ein Korrekturfaktor kalkuliert werden. Dieser wird für die Berechnung der tatsächlichen Hybridisierungsstärke aus den nukleären Run-on Experimente eingesetzt.

Zunächst wird eine DNA-Sequenz in einen Hilfsplasmid synthetisiert. Diese DNA-Sequenz ist revers-komplementär zur Sequenz der eingesetzten Oligos und somit identisch zur rDNA-Sequenz. Dieses Fragment von ca. 2,5kb Länge wird in das Hilfsplasmid inseriert. Proximal der Insertionsstelle weist das Hilfsplasmid einen T7-RNA-Polymerase Promotor auf. Das komplette Plasmid einschließlich des Fragmentes wird anschließend mittels eines EcoRV-Restriktionsenzymverdaues linearisiert. Das nun linearisierte Konstrukt dient als Templat für eine *in vitro* Transkriptionsreaktion durch eine T7-RNA-Polymerase. Neben ATP, CTP, UTP und GTP werden mit radioaktivem ³²Phosphat markierte CTP-Ribonukleotide zur Reaktion zugefügt und für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Zum Nachweis der vollständigen Transkription des Fragments wurde ein Ethidiumbromidgel mit 10% der produzierten RNA gefahren (Abb. 8). 90% der so *in vitro* generierten, radioaktiv markierten Einzelstrang-RNA wird dann auf eine Hybond-N+-Membran aufgetragen. Auf der Hybond-N+-Membran sind vorher die Oligos immobilisiert worden. Nach drei Tagen Inkubationszeit bei 58°C und mehreren Waschschritten wird die Hybridisierungsstärke mittels Autoradiographie ausgewertet (Abb. 9). Die einzelnen Banden auf den entwickelten Autoradiographiefilmen entsprechen den jeweiligen Oligos (siehe Auftragungsschema rechte Seite Abb. 9). Je intensiver die Bande desto stärker hat der Oligo an die *in vitro* generierte RNA hybridisiert. Das Experiment wurde fünfmal durchgeführt, um eine adäquate Berechnungsgrundlage für den folgenden Normalisierungsalgorithmus zu gewährleisten.

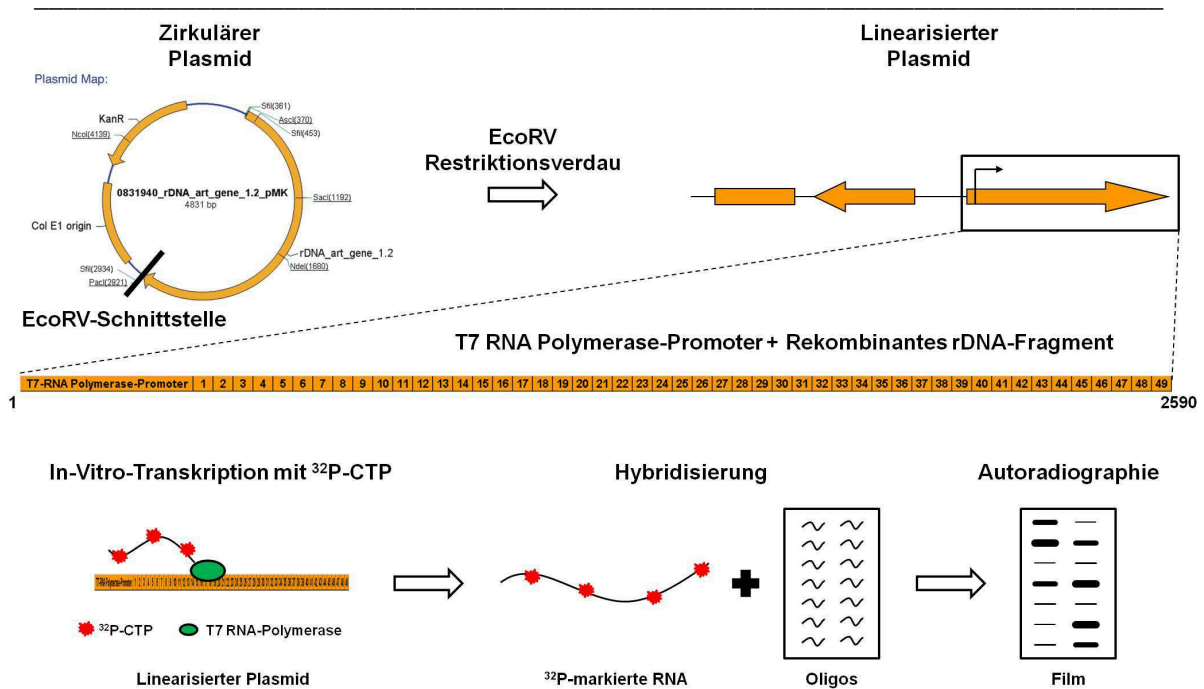


Abb. 7: Herstellung eines *in vitro* Transkriptionssystems zur Normalisierung der Hybridisierungsstärke von DNA-Oligonukleotiden mit variablem GC-Gehalt

Ein DNA-Fragment mit aneinandergereihten 50nt-rDNA-Sequenzen (insgesamt 2,5kb), die revers-komplementär zu den verwendeten Oligos sind, wurde synthetisiert und in ein Hilfsplasmid kloniert. Proximal der synthetisierten Sequenzen liegt ein T7-RNA-Polymerase-Promotor. Durch Restriktionsverdau mit EcoRV distal der synthetisierten Sequenz wurde das zirkuläre Konstrukt linearisiert. In einer *in vitro* Transkriptionsreaktion wird vom Doppelstrang-DNA-Templat eine ca. 2.5kb lange Einzelstrang-RNA mit inkorporierten ³²P-CTP durch die T7-RNA-Polymerase transkribiert. 10% der ³²P-markierten RNA wurden autoradiographisch erfasst. 90% wurden zur Hybridisierung mit 50 nt langen DNA-Oligos verwendet, die auf einer positiv geladenen Hybond-N+ Nylonmembran immobilisiert werden. 150 pmol jedes Oligos werden pro Auftragsposition immobilisiert. Nach mehreren Waschschritten und einem RNase-Verdau erfolgt die Auswertung der Hybridisierungsergebnisse auf der Membran mittels Autoradiographie.

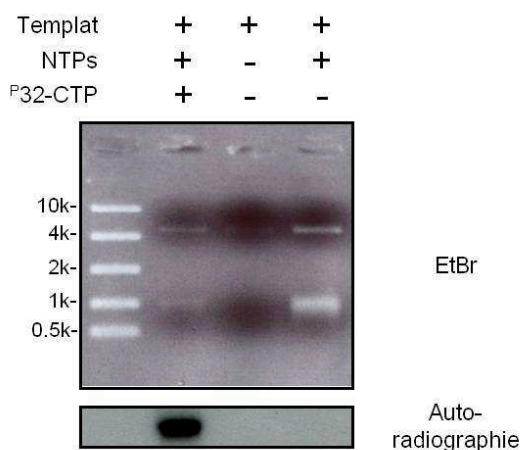


Abb. 8: Nachweis der vollständigen *in vitro* Transkription einer radioaktiv markierten RNA von einem linearisierten Plasmid

10% der mittels T7-RNA-Polymerase Transkription von einem synthetischen Templat hergestellten, radioaktiv markierten RNA wurde auf ein Ethidiumbromidgel (EtBr) aufgetragen und mittels UV-Licht dargestellt. Anschließend wurde das Gel auf Whatman®-Blottingpapier eingedampft und autoradiographisch dargestellt. In der 2. Und 4. Spur zeigt sich im Ethidiumbromidgel eine spezifische Bande auf Höhe einer 1kb großen DNA. Dies entspricht einer RNA-Länge von ca. 2kb. In der

Autoradiographie ist einzig in der 2. Spur eine Bande zu erkennen, die die radioaktiv markierten RNA darstellt.

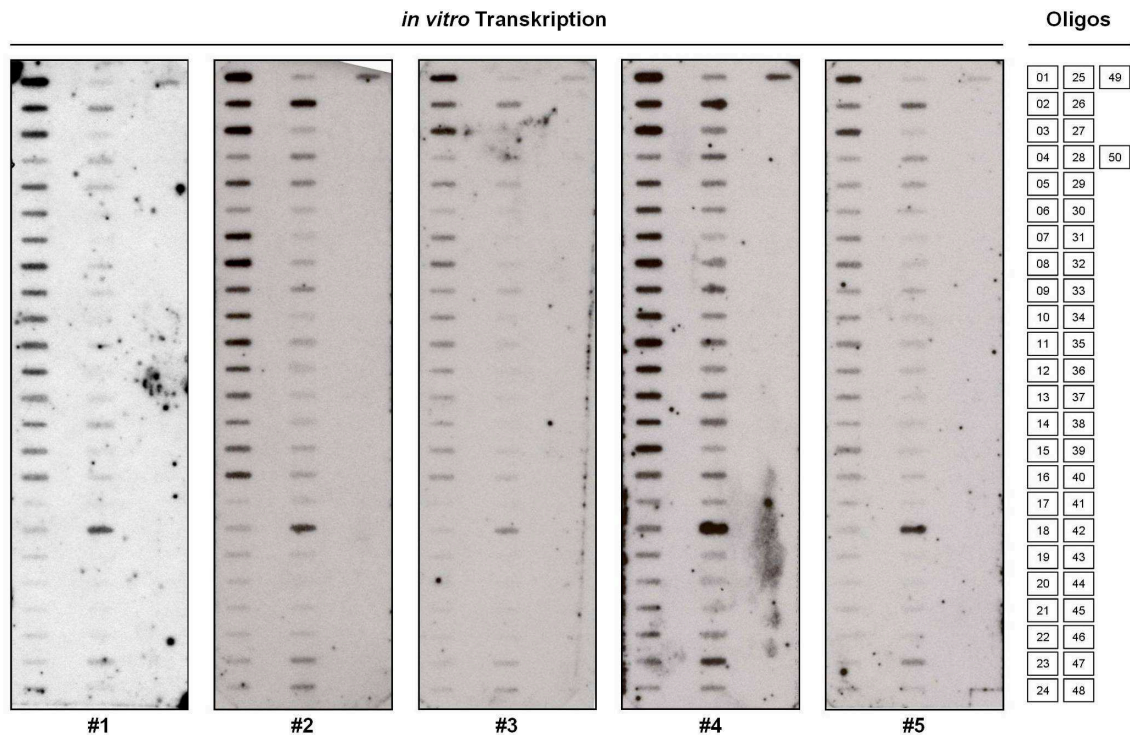


Abb. 9: Ergebnisse der Autoradiographie aus fünf *in vitro* Transkriptionsexperimenten
Abgebildet sind die Ergebnisse von fünf unabhängigen Experimenten, die zur Berechnung nach unten folgendem Algorithmus herangezogen wurden. Rechts davon ist das Schema der Oligoauftragung auf die Membran abgebildet. Oligo #50 ist als Negativkontrolle gegen einen Abschnitt der 7SK-RNA gerichtet, die nicht auf dem synthetisierten DNA-Templat codiert wurde.

3.3 Entwicklung eines Algorithmus zur Normalisierung der Hybridisierungsstärken von DNA-Oligonukleotiden mit variablem GC-Gehalt

Die Mittelwerte $M^{\text{in vitro}}$ der Hybridisierungsstärke der einzelnen Oligos an die korrespondierende, *in vitro* generierte RNA werden aus fünf unabhängigen Experimenten berechnet. Die Stärke des Autoradiographiesignals aus jedem Experiment wird zudem um das jeweilige Hintergrundsignal korrigiert (Abb. 10, linke Seite). Für die Berechnung der wahren Hybridisierungsstärke der *in vivo* generierten rRNA an die Oligos aus den Run-on Experimenten benötigen wir einen Normalisierungsfaktor F^{nl} . Für die Berechnung dieses Normalisierungsfaktor F^{nl} werden die Mittelwerte $M^{\text{in vitro}}$ durch 1 dividiert ($F^{\text{nl}} = 1/M^{\text{in vitro}}$). Dieser berechnete Normalisierungsfaktor F^{nl} wird mit der unkorrigierten Signalstärke $S^{\text{in vivo}}$ der *in vivo* rRNA-Oligo-Hybridisierung multipliziert. Als Resultat erhält man eine korrigierte *in vivo* Signalstärke S^{correct} der rRNA-Oligo-Hybridisierung des nukleären Run-on vom rDNA-Locus ($S^{\text{correct}} = S^{\text{in vivo}} * F^{\text{nl}}$).

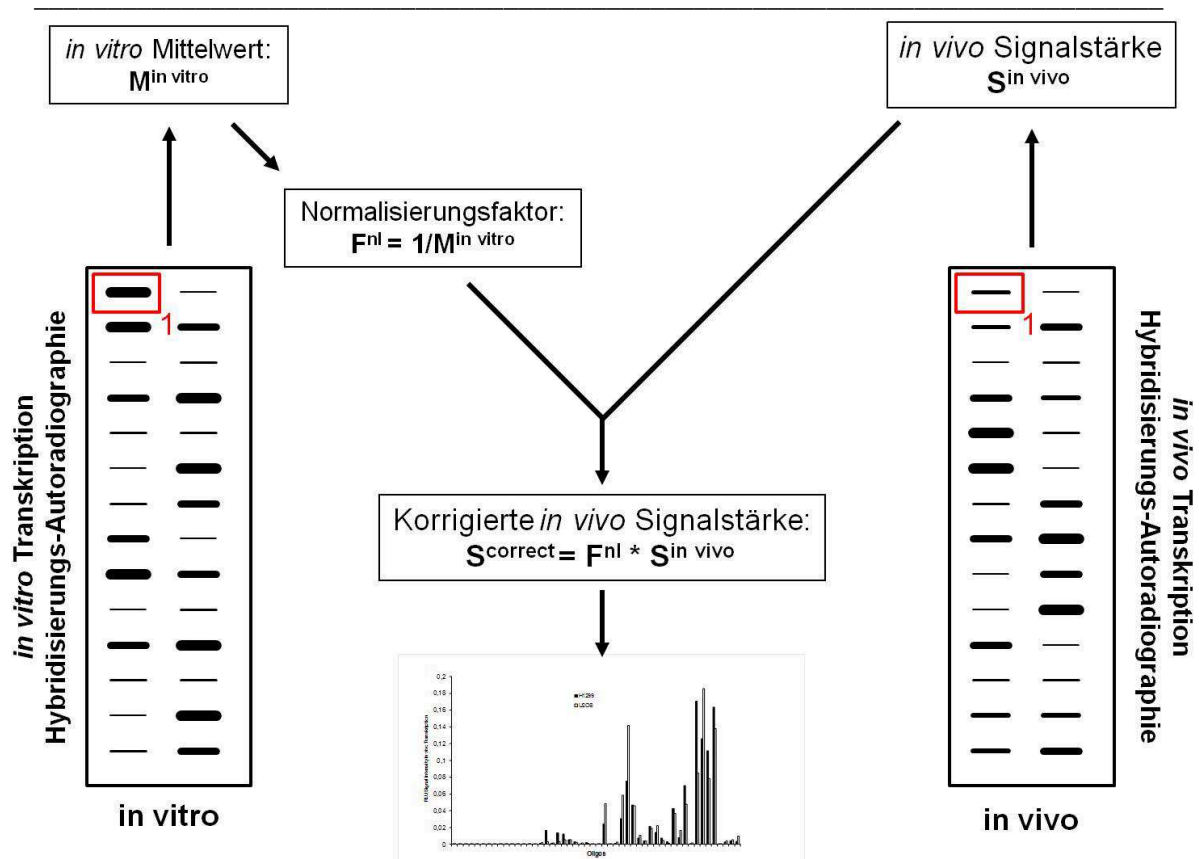


Abb. 10: Algorithmus zur Normalisierung der Hybridisierungssstärke von Oligos mit variablem GC-Gehalt

Die Ergebnisse der Hybridisierung der *in vitro* Transkription aus fünf Experimenten wurden zur Normalisierung herangezogen. Für jedes Oligonukleotid wird der *in vitro* Mittelwert $M^{\text{in vitro}}$ der Hybridisierungssignalstärke berechnet. Aus diesem wird mittels Division ($1/M^{\text{in vitro}}$) ein Normalisierungsfaktor F^{nl} gebildet. Dieser Normalisierungsfaktor wird mit der *in vivo* Hybridisierungssignalstärke $S^{\text{in vivo}}$ multipliziert. Damit wird die GC-varianzabhängige Hybridisierungssstärke der einzelnen Oligos herausgerechnet. Diese ermittelte GC-korrigierte Signalstärke S^{correct} eignet sich zur Analyse der Daten.

3.4 Nukleärer Run-on der rDNA in humanen Zellen

Der nukleäre Run-on wurde in den humanen Tumorzelllinien H1299 (Adenokarzinom der Lunge) und U2OS (Osteosarkom) durchgeführt. Die Reaktion wurde gemäß Protokoll mit bestimmten Modifikationen ausgeführt [217]. Nach Ausplattieren, Adhärenz und Proliferation der Zellen auf Kulturschalen werden diese nach 24-48 Stunden mit PBS (4°C) gewaschen und mittels Lysepuffer (4°C) ohne ionische oder denaturierende Detergenzien behandelt. Nach Lyse der Plasmamembran verbleiben die Zellkerne in der Kulturschale. Anschließend wird der nukleäre Run-on durch Zugabe des Reaktionspuffers (150 mM KCl; 5 mM MgCl₂; 0,5 mM ATP, UTP, GTP, CTP; 100 µCi ³²P-CTP; 10 mM Tris/HCl, pH 8,0) gestartet und für 60 Minuten bei 30°C aufrechterhalten. Die Reaktion wird durch Lysieren der Zellkerne beendet. Das Lysat wird auf RNA-Aufreinigungssäulen gegeben und die Kern-RNA durch Eluierung isoliert. 50 µl des Eluates werden anschließend auf eine Hybond-N+ Membran mit

immobilisierten Oligos gegeben und in Denhardt-Hybridisierungspuffer inkubiert. Drei Tage wird die Hybridisierung bei 58°C durchgeführt. Nach mehreren Waschschritten wird mittels Autoradiographie die Signalstärke der Hybridisierung von radioaktiv markierter rRNA an die Oligos ermittelt (Abb. 11).

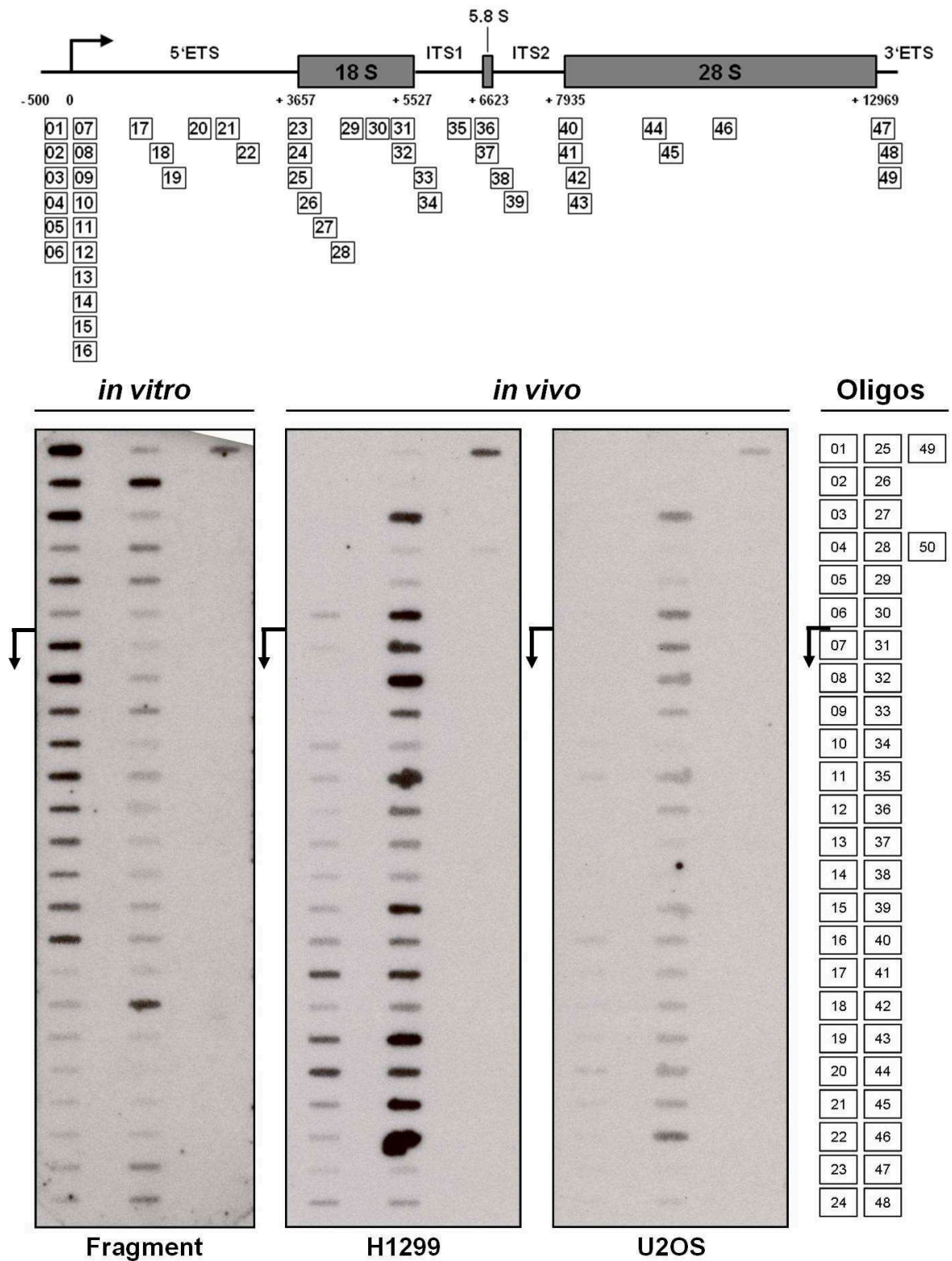


Abb. 11: Autoradiographie-Ergebnisse der *in vitro* und *in vivo* Transkriptionsexperimente

Abgebildet sind die Ergebnisse von nukleären Run-ons aus H1299- sowie U2OS-Zellen. Die Anordnung der Oligos entspricht den *in vitro* Experimenten (Auftragungsschema rechts). Die relative Position des Transkriptionsstarts auf der rDNA ist mit einem Pfeil markiert. Insgesamt wurden sechs Millionen (H1299) bzw. acht Millionen Zellen (U2OS) in 10cm-Kulturschalen ausplattiert. Nach Adhärenz wurden die Zellen zweimal mit PBS (4°C) gewaschen und bei 4°C lysiert. Nach Entfernen des Lysepuffers und nochmaligem PBS-Waschschritt, wurde in jede 10 cm-Kulturschale zwei ml Reaktionspuffer, der 100 μ Ci 32 P-CTP enthält, pipettiert und für 60 Minuten bei 30°C inkubiert.

Anschließend erfolgte die Lyse und RNA-Präparation mittels Säulenaufreinigung. Die Hybridisierung der RNA und Immobilisierung der Oligos erfolgte wie bei den *in vitro* Transkriptionsexperimenten.

Die ermittelte, unkorrigierte Signalstärke ($S^{\text{in vivo}}$) der einzelnen RNA-Oligo-Hybridisierung wurde nach obigem Algorithmus in die korrigierte *in vivo* Signalstärke (S^{correct}) umgewandelt. Abb. 12 zeigt eine Gegenüberstellung der *in vitro* (linkes Diagramm) und *in vivo* (rechtes Diagramm) generierten Daten (Hybridisierungssignal in relativen Einheiten). Die mittlere Tabelle schlüsselt die genaue Nukleotidposition der einzelnen Oligos zur revers-komplementären rDNA und den entsprechenden strukturellen Regionen der rRNA wie 18S und 28S auf. Zudem ist der GC-Gehalt der Oligos angegeben. Die Signalintensität in der Promotorregion und den ersten 500nt nach Transkriptionsstart ist sehr gering. Damit lag während der Reaktion eine geringe Pol I Dichte und Aktivität vor. Eine gering erhöhte Signalintensität findet sich im weiteren Verlauf des 5'ETS Abschnittes. Mit Beginn der 18S rRNA kommt es zu einer deutlichen Signalanhebung. In den folgenden ITS1, 5.8S und ITS2 Abschnitten kommt es zu einer Signalabschwächung. Die Signalintensität liegt jedoch deutlich über dem 5'ETS Bereich. Mit Beginn der 28S kommt es zu den stärksten detektierbaren Signalen des Experimentes. Im 3'ETS wiederum sinkt die Signalintensität deutlich ab. Insgesamt zeigen sich in den codierenden Abschnitten der 18S und 28S die stärksten Signale, sodass wir in diesen Bereichen von einer gesteigerten Pol I Konzentration und damit Aktivität ausgehen.

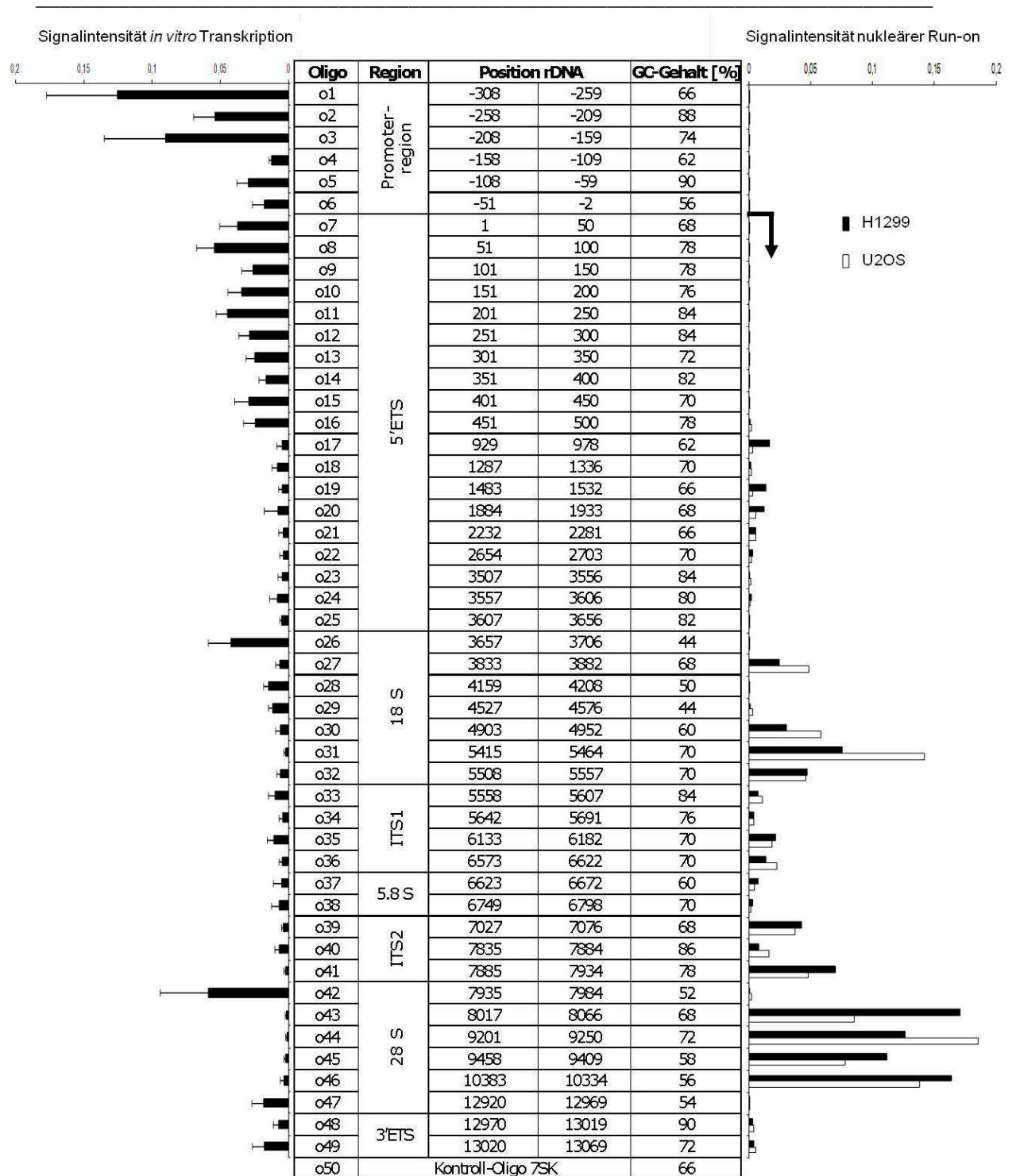


Abb. 12: Gegenüberstellung der Ergebnisse von *in vitro* und *in vivo* Transkriptionsexperimenten

Das linke Diagramm zeigt die Auswertung der *in vitro* Transkription von fünf Experimenten mit dem Mittelwert $M^{\text{in vitro}}$ der Hybridisierungssignalstärke und Standardabweichung in relativen Einheiten auf der Ordinate. Die Anordnung der Abszisse entspricht den in der Mitte aufgelisteten Oligos. Die Tabelle zeigt die Position der Oligos zu den korrespondierenden Sequenzen der rDNA relativ zum Pol I Transkriptionsstart (Pfeil) sowie den GC-Gehalt in Prozent. Das rechte Diagramm zeigt die Auswertung der *in vivo* Transkription anhand der korrigierten Signalstärke S^{correct} der Hybridisierung aus H1299 und U2OS-Zellen.

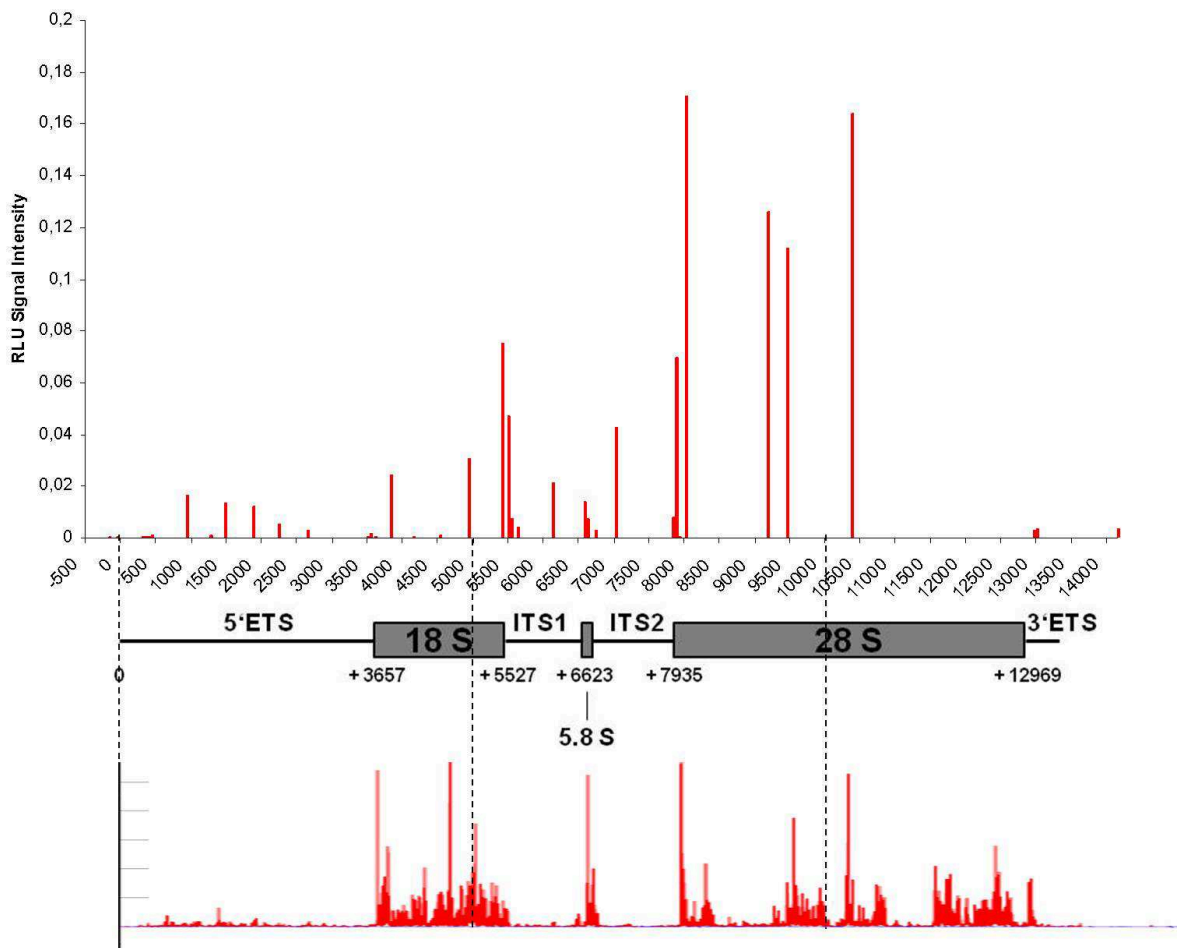
3.5 Vergleich der Ergebnisse aus nukleärem Run-on und globaler Run-on Sequenzierung (GRO-seq)

Die Methode des nukleären Run-on ermöglicht Aussagen über die Position und Konzentration von RNA-Polymerasen auf einem bestimmten Genabschnitt. Im Gegensatz zu Chromatin-Immunpräzipitationsexperimenten werden im nukleären Run-on nur aktiv transkribierende Polymerasen erfasst. Jedoch ist eine erhöhte Signalauflösung von großen Transkriptionseinheiten wie der rDNA mittels nukleärem Run-on mit einem hohen Aufwand verbunden, da viele Oligos synthetisiert und einzeln auf die Membran aufgetragen werden müssen. In den letzten Jahren konnten durch Fortschritte in der Sequenzierungstechnik von Nukleinsäuren neue Verfahren zur Erfassung von Transkriptionsaktivität entwickelt werden [213]. Mithilfe der sogenannten globalen Run-on Sequenzierung (GRO-seq), die im Labor von John Lis, Ithaca USA, entwickelt wurde, können Position, Anzahl und Transkriptionsrichtung aktiver RNA-Polymerasen über große Abschnitte des Genoms in hoher Auflösung bestimmt werden. Anstelle von radioaktiven Nukleotiden verwendet diese Technik 5-Bromouridin-5'-Triphosphat (BrUTP), um neu transkribierte RNA zu markieren. Mittels Bindung an Bromouridin(BrU)-spezifische Antikörper kann die generierte BrU-haltige RNA isoliert und angereichert werden. Die gewonnenen Transkripte werden anschließend durch eine Reverse Transkriptase in cDNA umgewandelt, amplifiziert und aufgereinigt. Diese cDNA-Bibliothek wird hochauflösend sequenziert. Daraus ergibt sich eine vollständige Erfassung von RNA-Polymerase-Aktivität auf einem Gen. Ergebnisse für RNA-Polymerase II (Pol II) auf proteinkodierenden Genen zeigten verschiedene Transkriptionsaktivitätsmuster. Ein häufiges Muster stellt das sogenannte *promoter proximal pausing* der Pol II dar. Dabei sind transkriptionell aktive Pol II Moleküle in höherer Konzentration am 5' Ende des Gens vorhanden, ca. 20-50 Basenpaare proximal des Transkriptionsstarts, also nahe des Promotors. Es gibt ebenso Pol II transkribierte Gene, die ohne *promoter proximal pausing* transkribiert werden. Dementsprechend ist bei diesen aktiven, nicht pausierten Genen die Transkriptionsaktivität der Pol II über die Länge des Gens nahezu gleich verteilt. Tatsächlich scheint auch eine divergierende Transkription entlang des Antisense-Strangs der DNA bei vielen Genen zu existieren. Das Signalmuster für die Transkription der rDNA durch Pol I ist noch unbekannt. Verschiedene Szenarien wären denkbar. Aufgrund der bekannten kotranskriptionellen Modifikation der rRNA wäre es möglich, dass die Pol I entlang der rDNA-Abschnitte, deren rRNA später mit vielen Modifikationen ausgestattet wird, langsamer transkribiert. Wahrscheinlich wäre eine Konzentrationserhöhung der Pol I an diesen Positionen oder etwas distal davon zu messen. Andererseits wäre es vorstellbar, dass die Pol I aufgrund ihrer bekannt hohen Produktionsraten mit hoher Prozessivität entlang der rDNA transkribiert. In diesem Fall müsste sich eine homogene Verteilung der Pol I auf der

rDNA zeigen. Denkbar wäre auch eine Blockabfertigung, bei der Pol I Moleküle in Gruppen die verschiedenen rRNA-Abschnitte transkribieren. Dabei könnten erhöhte Pol I Konzentrationen kurz vor den oder innerhalb der 18S, 5.8S und 28S zu sehen sein.

Die Daten für die Sequenzabschnitte rDNA aus den GRO-seq-Experimenten wurden uns von John Lis überlassen. Ziel ist der Vergleich der Daten aus konventionellem nukleärem Run-on mit denen aus GRO-seq. In Abb. 13 wurden Daten aus nukleärem Run-on (H1299 (A) und U2OS (B)) und GRO-seq (humanen Fibroblasten) entlang der ersten 14kb der rDNA gegenübergestellt. Dies entspricht der Länge der 18S, 5.8S und 28S für die spätere ribosomale RNA innerhalb der rDNA. Die Signalstärke ist jeweils in relativen Einheiten angegeben. Zur Orientierung wurde das Schema der rDNA mit den einzelnen 18S, 5.8S und 28S Abschnitten angefügt.

A



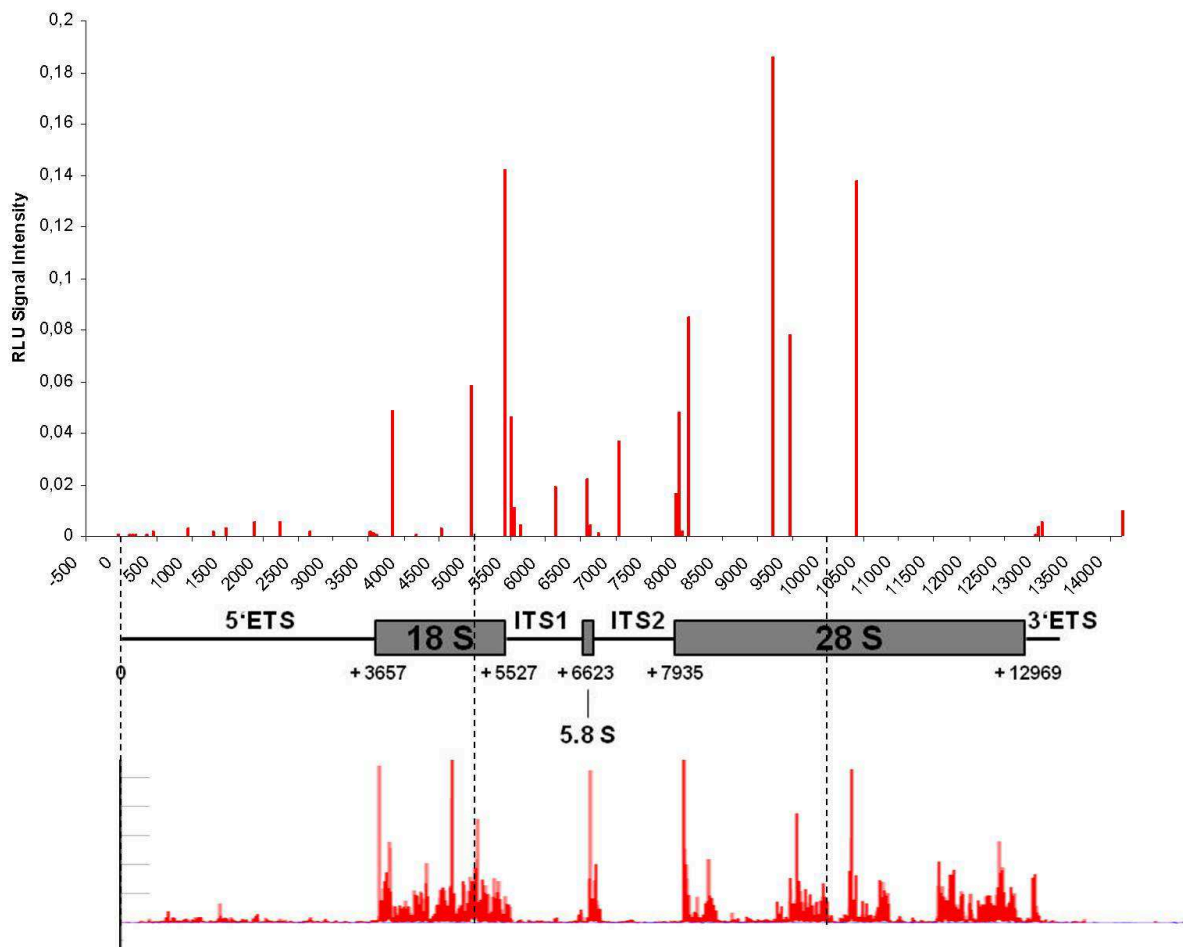
B

Abb. 13: Diagramm der korrigierten Signalstärke S^{correct} aus den nukleären Run-on für (A) H1299 und (B) U2OS sowie GRO-seq-Ergebnisse (humane Fibroblasten) des ribosomalen Locus relativ zum Transkriptionsstart

Die korrigierte Signalstärke S^{correct} aus nukleärem Run-on wurde den einzelnen Positionen der korrespondierenden rDNA-Abschnitte maßstabsgerecht zugeordnet. Die Abszisse entspricht der rDNA-Position relativ zum Transkriptionsstart (+1), die Ordinate den relativen Einheiten der korrigierten Signalstärke S^{correct} . Unterhalb des Diagramms wurde ein Schema des primären 47S rRNA-Transkripts sowie die Ergebnisse aus GRO-seq-Experimenten (John Lis Labor) entlang der korrespondierenden x-Achsen-Beschriftung gesetzt.

Für die Pol I Transkription der rDNA konnten mit beiden Methoden korrespondierende Ergebnisse ermittelt werden. Im Bereich des Promotors (für Nukleotidposition siehe Abb. 12 und Abb. 13) finden sich mittels nukleärem Run-on relativ geringe Signalstärken. Hier fehlen vergleichbare Daten aus den GRO-seq-Experimenten, da diese uns erst vom Transkriptionsstart abwärts vorliegen. Von 5'ETS bis zum Beginn der 18S zeigen sich mit beiden Methoden keine deutlich erhöhten Signale respektive Signalspitzen. Mit Beginn der 18S steigen die Signalintensitäten an. Mit beiden Methoden wird deutlich, dass die basale Verteilung der Pol I in 18S insgesamt konzentrierter ist als in 5'ETS. Entlang der 18S selbst ist die Verteilung heterogener. Es zeigen sich Signalspitzen, die von Abschnitten geringerer Signalintensität unterbrochen werden. Dies wird insbesondere mit der höher auflösenden GRO-seq-Methode deutlich. Im nukleären Run-on zeigen sich starke Signale am Ende der

18S im Übergang zu ITS1. In ITS1 finden sich mit nukleärem Run-on wie mit GRO-seq schwache Signale. Ein deutlicher Unterschied der Ergebnisse von Run-on und GRO-seq liegt im Bereich der 5.8S und ITS2 vor. Die 5.8S zeigt im nukleären Run-on zwar Signale, jedoch deutlich schwächer als in 18S und 28S. Mit GRO-seq ist eine starke Signalanhebung in der 5.8S zu sehen. In ITS2 liefern drei Oligos im nukleärem Run-on Signale, die in der Intensität zwischen den vorherigen 18S und ITS1 liegen. Mit GRO-seq ergeben sich hingegen für ITS2 ähnlich schwache Signale wie im vorherigen 5'ETS und ITS1 Bereich. Im 28S Bereich korrespondieren die Signale von Run-on und GRO-seq weitestgehend. Im nukleärem Run-on sind die Signale von zwei Oligos unmittelbar vor Beginn der 28S erhöht, um dann in den ersten 50nt von 28S stark abzusinken. Die Signale der nächsten, über die 28S verteilten vier Oligos sind die signalintensivsten im nukleären Run-on. Beim Übergang von 28S auf 3'ETS sinkt die Intensität wieder stark ab. Im GRO-seq zeigt sich ein differenzierteres Bild aufgrund der höheren Auflösung. Zu Beginn von 28S steigt das Signal an und fluktuiert dann über ca. 500nt. Anschließend zeigt sich eine ca. 750nt lange signalarme Strecke gefolgt von einer ca. 750nt langen Signalanhebung mit mehreren Signalspitzen. Daraufhin schließt sich eine ca. 100nt kurze signalarme Strecke an, der wiederum eine 750nt lange Signalanhebung mit deutlichen Signalspitzen folgt. Dann sinkt das Signal wieder für 600nt ab, bevor ein 1000nt langes signalintensives Stück beginnt. Ca. 200nt vor Ende der 28S zeigen sich noch einmal starke Signalanhebungen. Dann läuft das Signal in 3'ETS auf niedrigem Niveau aus.

Zusammenfassend ergibt sich ein im Vergleich zu Pol II Genen sehr heterogenes Transkriptionsmuster [213]. Abschnitte mit reduzierten Signalen werden abgelöst von Sequenzen mit hoher Signalintensität und einzelnen Signalspitzen. Es fällt auf, dass eine erhöhte durchschnittliche Signalintensität entlang der Sequenzen der späteren reifen ribosomalen RNAs 18S, 5.8S und 28S vorliegt (Abb. 14). Die Ausnahme sind die ermittelten Signale von 5.8S im nukleären Run-on. Im Bereich der 28S finden sich abwechselnd sehr hohe und niedrige Signalintensitäten. Im Gegensatz ist die Signalausprägung in den nicht-strukturellen Bereichen wie 5'ETS, ITS1, ITS2 und 3'ETS deutlich niedriger.

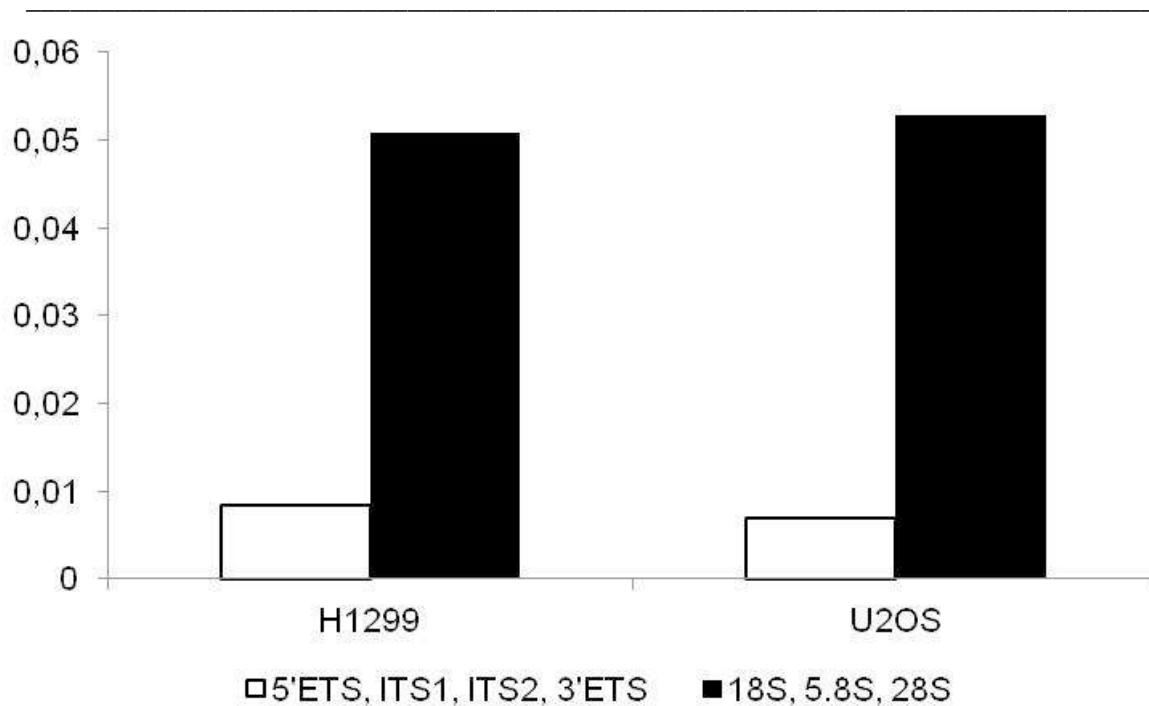


Abb. 14: Vergleich der Signalstärke im Bereich der Teilsequenzen der rDNA aus den nukleären Run-on Experimenten

Der Mittelwert der Hybridisierungssignalstärken der Oligos aus den Sequenzen der 5'ETS, ITS1, ITS2 und 3'ETS wurde mit den Signalstärken der späteren reifen rRNA (18S, 5.8S, 28S) verglichen. Die Signalstärke ist auf der Ordinate in relativen Einheiten wie in den vorherigen Abbildungen angegeben. Die Abszisse trennt zwischen den H1299- und U2OS-Zellen und den jeweiligen Sequenzabschnitten auf.

3.6 Transkribierende RNA-Polymerase I konzentriert sich an rDNA-Sequenzen die ko- und posttranskriptioneller Modifikation unterliegen

Transkribierende Pol I konzentriert sich entlang der rDNA in bestimmten Bereichen. Insbesondere mit GRO-seq wird eine Diskriminierung der Polymerasedichte zwischen einerseits den Abschnitten der 18S, 5.8S und 28S und andererseits den 5'ETS, ITS1, ITS2 und 3'ETS Abschnitten deutlich. Eine Erklärung könnte die Rekrutierung von rRNA-Prozessierungs- und Modifikationsfaktoren an die jeweiligen rDNA-Abschnitte sein. Kotranskriptionelle Prozessierung und Modifikation der rRNA sind aus der Hefe bekannt [51]. Die Schnittstellen und Basenmodifikationen wie Methylierung und Pseudouridinylierung der rRNA sind für viele Spezies kartiert. Die menschliche rRNA wird an ca. 115 Nukleotiden methyliert und an 95 Uridinen pseudouridinyliert. Diese Aufgabe übernehmen snoRNPs, also Ribonukleinsäure-Proteinkomplexe, die kleine, nichtkodierende nukleoläre RNA-Moleküle (snoRNA) enthalten [44, 45].

Einen Hinweis auf die gekoppelte Aktivität von Pol I und rRNA-Modifizierungs-snoRNPs könnte der Vergleich der Ergebnisse aus Run-on und GRO-seq-Experimenten mit den publizierten Modifikationspositionen der humanen rRNA erbringen. Diese Modifikationen sind in Eukaryoten bisher ausschließlich in den reifen rRNA-Sequenzen (18S, 5.8S und 28S) nachgewiesen worden. Methylierungen werden an ATP, CTP, GTP und UTP durchgeführt, Pseudouridinylierung an UTP.

Die Mittelwerte der Hybridisierungssignalstärken für Oligos aus nukleärem Run-on, die an Abschnitte der 18S, 5.8S und 28S rRNA mit und ohne Modifikationen binden, wurden verglichen und nach der Anzahl der Modifikationen in diesen 50nt Abschnitte aufgeschlüsselt. So zeigt sich zumindest ein höherer Mittelwert der Signalintensität in den Abschnitten, die später modifiziert werden (Abb. 15). Eine direkt proportionaler Zusammenhang zwischen der Anzahl der Modifikationen und der Signalintensität lässt sich nicht eindeutig erkennen. Zur genaueren Analyse wurde die Position der humanen rRNA-Modifikationen und die hochauflösenden Ergebnisse aus GRO-seq übereinanderprojiziert (Abb. 16 A). Die Vergrößerung der einzelnen rRNA codierenden Abschnitte (Abb. 16 B-D) zeigen ein eindeutiges Muster. Wir können zeigen, dass Pseudouridinylierungen und Methylierungen in Bereichen mit erhöhter Pol I Konzentration auftreten. In 18S und 5.8S codierenden Sequenzen sind die Modifikationen relativ gleichmäßig über deren Länge verteilt. Entsprechend ist die Signalstärke in 18S und 5.8S auch relativ gleichmäßig erhöht (B,C). Die 28S hat über ihre Länge abwechselnd Abschnitte mit hoher und niedriger Pol I Konzentration. Gerade in den codierenden Abschnitten mit hoher Signalintensität finden sich die Basenmodifikationen. In signalarmen Abschnitten sind Modifikationen hingegen nicht vorhanden (D).

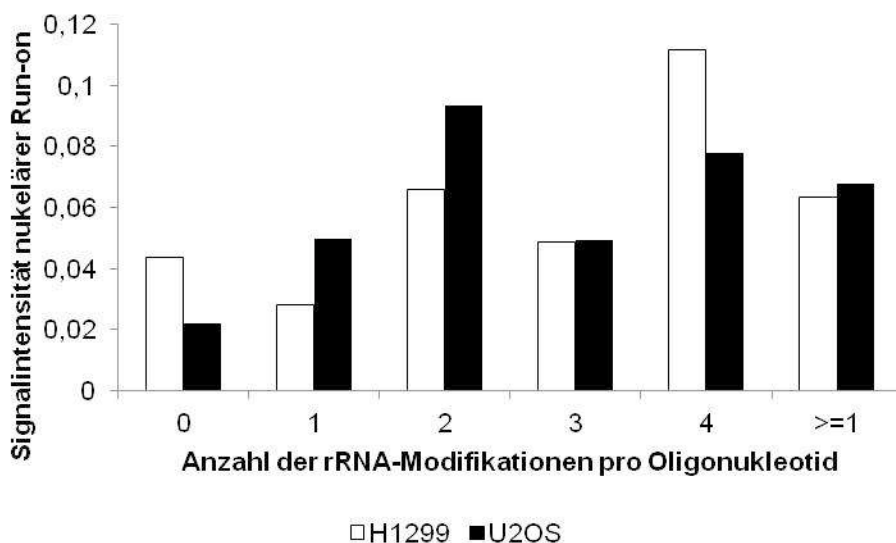
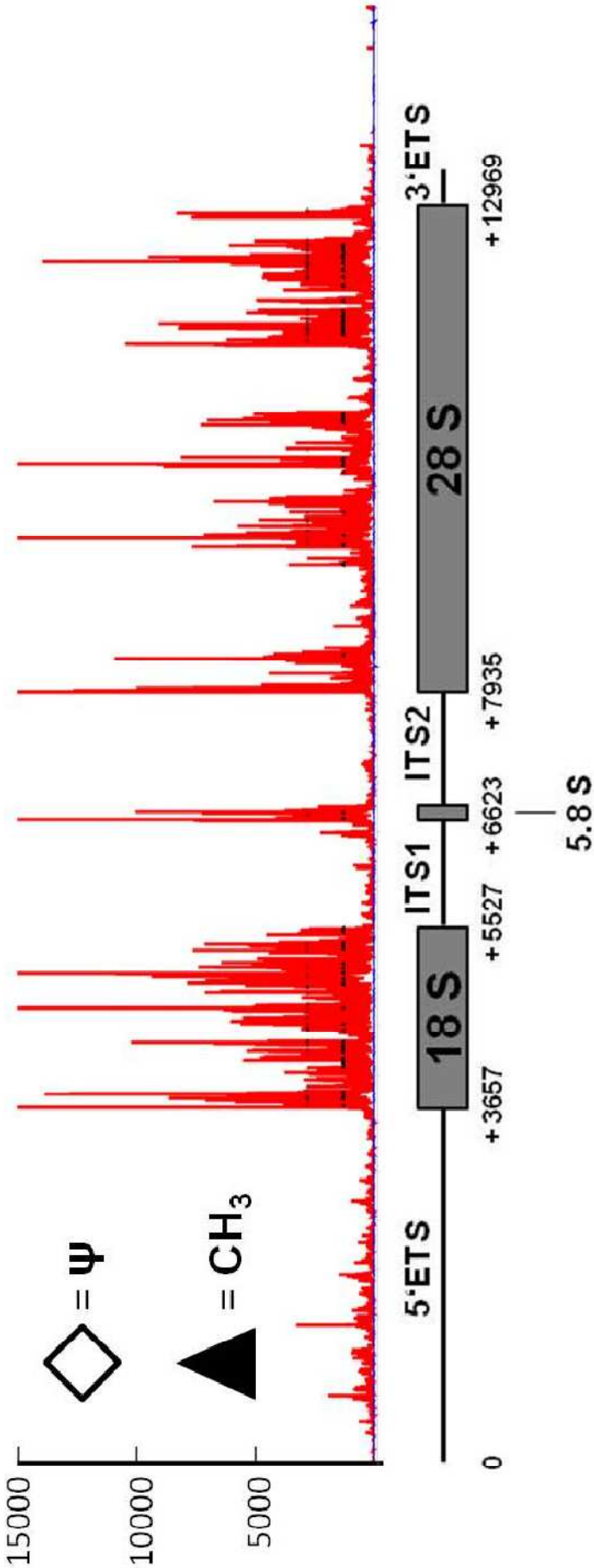


Abb. 15: Vergleich der Hybridisierungssignalstärke in Abhängigkeit von der Anzahl der rRNA-Modifikationen pro Oligonukleotid-rRNA-Hybridisierung aus nukleärem Run-on.

Der Mittelwert der Hybridisierungssignalstärken der Oligonukleotide an die Sequenzen der 18S, 5.8S und 28S wurde für die Anzahl der rRNA-Modifikationen ($n=0$ bis $n=4$ sowie $n \geq 1$ Modifikationen pro Oligonukleotid) im jeweiligen Sequenzabschnitt der Oligonukleotid-rRNA-Hybridisierung verglichen. Die Signalstärke ist auf der Ordinate in relativen Einheiten wie in den vorherigen Abbildungen angegeben. Die Abszisse trennt zwischen der Anzahl der rRNA-Modifikationen und H1299- und U2OS-Zellen auf.

A



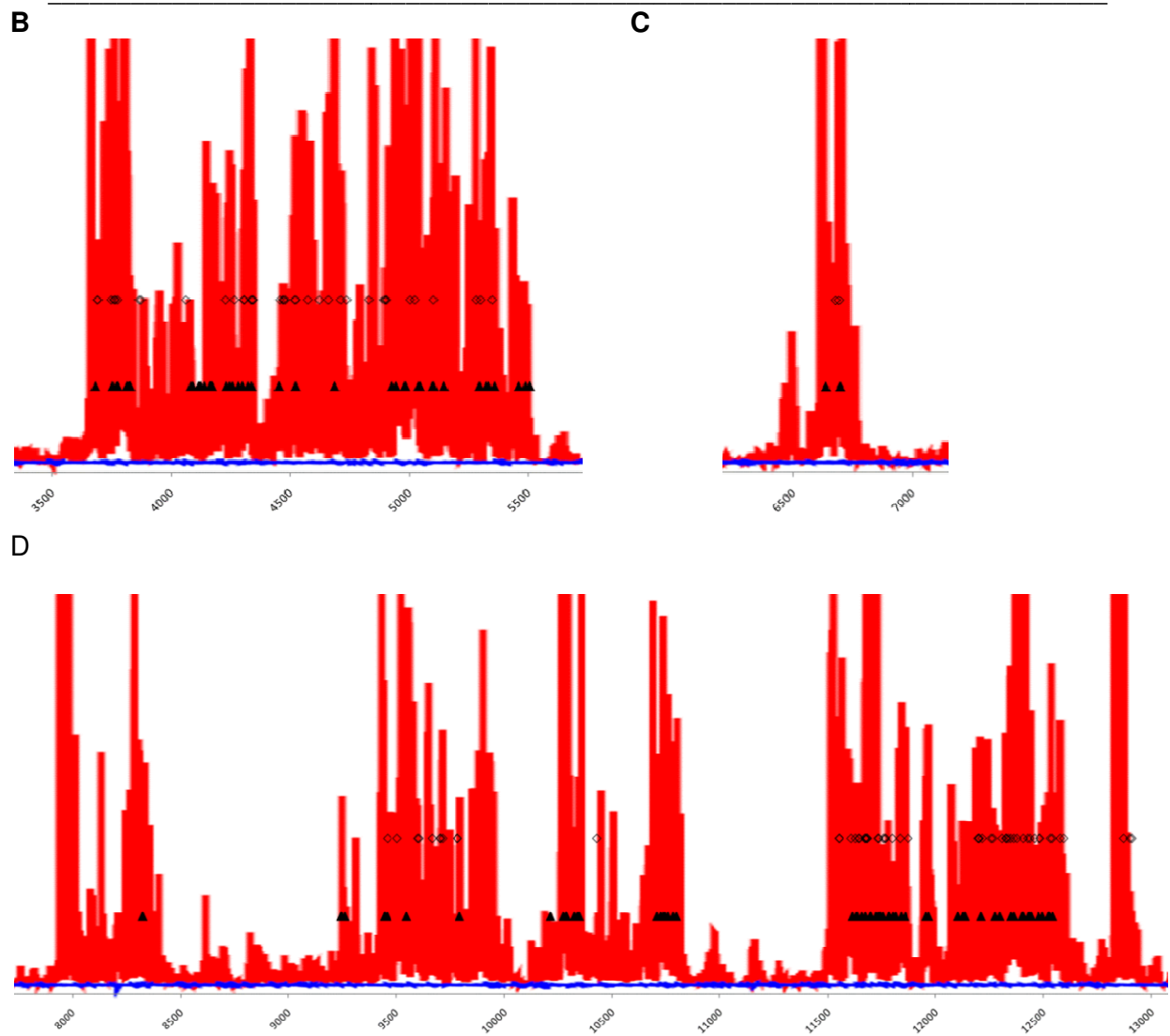


Abb. 16: Superposition der GRO-seq-Daten mit den Modifizierungsstellen der korrespondierenden rRNA

Auf GRO-seq-Daten des rRNA-Genlocus wurden die Basenmodifikationen der späteren rRNA an den korrespondierenden rDNA-Positionen projiziert. Methylgruppen der rRNA sind als schwarzes Dreieck und Pseudouridinylierungen als weißes Karo an den korrespondierenden rDNA-Positionen (Abszisse) dargestellt. Die Ordinate gibt die Anzahl der Sequenzierungstreffer pro Kilobase der DNA-Sequenz an. Gezeigt ist der (A) gesamte rRNA sowie Vergrößerungen der einzelnen rRNA Subspezies (18S in B, 5.8S in C, 28S in D).

4 Diskussion

4.1 Interpretation der Ergebnisse

Nukleärer Run-on und GRO-seq erfassen die Transkriptionsaktivität anhand der Konzentration von aktiven RNA-Polymerasen an einem bestimmten DNA-Abschnitt. Erhöhte Signalintensität lässt daher auf erhöhte Polymerasedichte schließen. Transkribierende RNA-Polymerase I Moleküle zeigen im nukleären Run-on eine heterogene Verteilung entlang der rDNA. Im Bereich des Promotors und des Transkriptionsstarts finden sich wenige Polymerasen, was gegen eine Regulation der Pol I Aktivität durch promotornahes Pausieren spricht. Abschnitte, die für die späteren 18S, 5.8S und 28S rRNA kodieren, weisen erhöhte Konzentrationen von Pol I auf. Basen der rRNA, die im reifen Ribosom methyliert oder pseudouridinyliert sind, liegen ausschließlich in Abschnitten mit hoher Pol I Konzentration.

Dies lässt eine Kopplung von rDNA-Transkription und kotranskriptioneller rRNA-Modifikation vermuten. Kotranskriptionelle Prozessierung, also das enzymatische Herausschneiden von Teilen der naszierenden rRNA durch Endo- und Exonukleasen an definierten Positionen, und kotranskriptionelle Basenmodifikation wie Methylierung und Pseudouridinylierung sind insbesondere aus der Hefe bekannt [51]. Für die Kopplung von Transkription mit rRNA-Prozessierung und Basenmodifikation müssen bereits kotranskriptionell Prozessierungs- und Modifikationsfaktoren an die jeweiligen rDNA-Abschnitte rekrutiert werden.

Ein Modell wäre wie folgt denkbar: Die Pol I Transkription der rDNA wird initiiert und die rRNA-Spacersequenzen (5'ETS, ITS1, ITS2, 3'ETS) werden mit hoher Prozessivität transkribiert. Die Konzentration von Pol I ist aufgrund der hohen Geschwindigkeit in diesen Abschnitten zu einem bestimmten Zeitpunkt geringer. Dann stoppen oder verlangsamen sich die Pol I kurz vor Beginn der 18S, 5.8S oder 28S im Sinne eines *pausing*. Prozessierungs- und Modifikationsenzyme werden rekrutiert und assoziieren mit der Transkriptionsmaschinerie oder der naszierenden prä-rRNA. Wenn alle Prozessierungs- und Modifikationsfaktoren positioniert sind, kann die Pol I über den 18S, 5.8S und 28S Abschnitt der rDNA transkribieren. Denkbar wäre ein Checkpoint zu Beginn der 18S, 5.8S und 28S, der bei Aktivierung eine koordinierte Kopplung von Transkription und Modifikation zulässt.

Die Prozessivität der Pol I entlang von 18S, 5.8S und 28S wäre damit geringer, da viele snoRNPs (beispielsweise das *SSU processome*) und Topoisomerasen kotranskriptionell sowohl die naszierende rRNA als auch das rDNA-Chromatin bearbeiten. Entweder verlangsamt sich die Pol I aufgrund der Masse an assoziierten Proteinen und snoRNAs oder eine aufwendige permanente Qualitätssicherung der produzierten rRNA wird durchgeführt, um eingebrachte Basenmodifikationen erlauben und kontrollieren zu können. Die Pol I

besitzt interessanterweise einen intrinsischen Enzymmechanismus, der falsch inkorporierte Ribonukleotide herausschneidet [165].

Denkbar wäre auch, dass mehrere Pol I Moleküle ähnlich einer Blockabfertigung jeweils kurz hintereinander über die 18S, 5.8S und 28S transkribieren. Eine funktionelle Kopplung scheint eine interessante Möglichkeit zu sein, die durch experimentelle Daten unterstützt wird [218]. Die Pol I spezifischen Untereinheiten RPA34 und RPA49 werden als Heterodimer für die hohe Polymerasedichte benötigt und sorgen für den Kontakt zwischen den Pol I Molekülen. Dabei bindet RPA49 einer Pol I an die benachbarte Untereinheit RPA43 der nächsten Pol I. Eine andere Möglichkeit wäre, dass kotranskriptionelle Faktoren schon auf der rDNA im Bereich der späteren 18S, 5.8S und 28S gebunden sind und die Pol I bei Kontakt verlangsamen. Die Ausbildung des sogenannten *SSU processome*, einem snoRNP bestehend aus der U3 snoRNA und wahrscheinlich mehr als 70 Proteinen, gibt Hinweise auf diese Theorie. Morphologisches Korrelat des *SSU processome* stellen die elektronenmikroskopisch erkennbaren Verdichtungen am 5'-Ende der naszierenden rRNA in *Miller spreads* dar (*terminal knobs*) [219]. Das *SSU processome* entsteht kotranskriptionell [215], dient gleichzeitig der Pol I Transkription sowie der Prozessierung der 18S rRNA [220] und besteht aus drei Subkomplexen (UTP A, UTP B, UTP C) [221]. Der UTP A Subkomplex beinhaltet sogenannte t-Utp Proteine (t für Transkription), deren Deletion zu reduzierter Pol I Transkriptionsrate führt. Die t-Utp Proteine sind, unabhängig von aktiver Pol I Transkription, auf der rDNA noch vor der vollständigen Ausbildung des *SSU processome* gebunden [170, 222]. Wenn Pol I auf die an rDNA gebundenen t-Utp Proteine trafe, würde sie verlangsamt werden. Die noch fehlenden UTP Subkomplexe werden dann an die rRNA rekrutiert. Anschließend könnte die Pol I weitertranskribieren und sich das *SSU processome* vollständig ausbilden. Damit wäre sichergestellt, dass die Transkription mit der Prozessierung der 18S rRNA verbunden wird.

Andererseits könnte die Transkriptionstermination die Pol I Dichte beeinflussen. Durch die dichte Beladung der rDNA in den 18S, 5.8S und 28S Abschnitten mit Pol I wäre ein Rückstau denkbar, sodass die Transkription von weiter stromaufwärts gelegenen Pol I gehemmt wird. Die gebundenen Pol I können nicht mehr reinitiierten, sodass ein Engpass für die Präinitiationskomplexformation aufgrund mangelnder freier Pol I Moleküle entsteht. Denkbar wäre auch ein negativer Rückkopplungsmechanismus, der verhindert, dass zu viele Pol I Moleküle kurz hintereinander initiieren. Dafür spräche die sehr hohe Pol I Konzentration auf rDNA in Säugerzellen [223].

4.2 Methodendiskussion

4.2.1 *In vitro* Transkriptionssystem

Durch den Einfluss des unterschiedlichen GC-Gehaltes der DNA-Oligonukleotide auf die Hybridisierungstemperaturen, musste bei der Analyse der nukleären Run-on Reaktionen die folglich unterschiedliche Hybridisierungsstärke berücksichtigt werden. Daher wurde ein *in vitro* Standardisierungsansatz zur Quantifizierung der Hybridisierungsstärke der einzelnen Oligonukleotide verfolgt. Von einem synthetischen, linearisierten DNA-Plasmid transkribiert eine T7-RNA-Polymerase eine RNA, die revers-komplementär zu den eingesetzten Oligonukleotiden ist und hintereinandergeschalteten rDNA-Sequenzen von jeweils 50 Nukleotiden Länge entspricht. Diese wird mittels RNA-Isolierungskit aufgereinigt und an die Oligonukleotide hybridisiert. Aus dem jeweiligen Signal der Hybridisierung der Oligonukleotide an die korrespondierende RNA-Sequenz lässt sich die individuelle Hybridisierungsstärke bei 58°C errechnen. Einige Oligonukleotide werden stärker als andere bei 58°C an ihre komplementäre RNA binden und ein stärkeres Signal ergeben. Eine ausreichende Sequenzspezifität der Oligonukleotide ist bei einer Länge von 50 Nukleotiden gegeben, so dass wir von einem geringen Anteil unspezifischer Bindungen sowohl im *in vitro* als auch im *in vivo* Transkriptionssystem ausgehen. Zwischen denjenigen rDNA-Sequenzen des Plasmids, die in genomischer rDNA nicht direkt aufeinanderfolgen, wurden drei zusätzliche Desoxyadenosin oder –thymidinreste hinein synthetisiert. Damit soll der Abstand zwischen diesen Sequenzen in der genomischen rDNA simuliert und eine sequenzübergreifende, unspezifische Bindung verhindert werden. Für die Prähybridisierung und Hybridisierung wurde ein Denhardt-Puffer verwendet, der aus mehreren hochmolekularen Polymerbestandteilen (Ficoll 400, Bovines Serumalbumin, Polyvinylpyrrolidon) besteht und unspezifische Bindungsstellen aufsättigt. Durch die Wahl dieses Puffers wird die Bindungsspezifität der generierten RNA an die DNA-Oligonukleotide weiter gesteigert.

Bei der Berechnung der Hybridisierungsstärke wird vorausgesetzt, dass die gleiche Anzahl von *in vitro* generierten RNA-Molekülen auf die jeweiligen immobilisierten Oligonukleotide zur Hybridisierung gegeben wird. Folglich ist das Verhältnis der Stoffmenge von generierter RNA zu Oligonukleotid stets identisch und scheidet als möglicher Störfaktor aus.

Ein Verzerrung der Signalstärke kann durch Hybridisierung unvollständiger Transkripte an die Oligonukleotide auftreten. Die T7-RNA-Polymerase ist zwar in der Lage, vollständige RNA-Moleküle von mehreren Kilobasen Länge zu generieren, die Generierung unvollständiger Transkripte von linearisierten DNA-Templaten ist jedoch in der Literatur beschrieben und tritt insbesondere bei GC-reichen Sequenzen auf. Dadurch würde die Signalintensität indirekt proportional zur Entfernung der jeweiligen rDNA-Sequenz vom T7-

RNA-Polymerase Promotor sein. Tatsächlich fällt die Signalintensität über die ersten 16 Oligonukleotide sukzessive ab und die anschließenden 33 Oligonukleotide zeigen mit Ausnahme von Oligonukleotid 26 und 42 ein annähernd gleich starkes Signal. Ein Teil der generierten, radioaktiv markierten RNA wurde daher zur Kontrolle in einem Agarose-Ethidiumbromid-Gel aufgetrennt und anschließend auf Whatman-Papier eingedampft. Diese RNA wurde mittels UV-Licht und Autoradiographie dargestellt. Dabei zeigte sich eine einzige spezifische Bande, die mit der Länge des vollständigen Transkriptes korrespondiert, jedoch keine kleineren RNA-Banden oder verschmierte Signale. Aberrante Transkripte treten zudem bei enzymatisch linearisierten DNA-Templaten mit 3'-Überhängen auf. Um dies zu verhindern, wurde mit dem Restriktionsenzym EcoRV ein stumpfes, nicht überhängendes Ende generiert.

Nach Anwendung des Normalisierungsalgorithmus auf die Signalstärken des nukleären Run-ons, sprechen zudem die korrespondierenden GRO-seq Daten mit ähnlicher Signalausprägung für die korrekte Analyse der *in vitro* Transkription.

4.2.2 Algorithmus zur Normalisierung der Hybridisierungsstärken von DNA-Oligonukleotiden

Der Normalisierungsalgorithmus leitet aus dem Mittelwert der *in vitro* Hybridisierungsstärke mithilfe eines Korrekturfaktors, welcher die unterschiedlichen Hybridisierungseigenschaften bei 58°C berücksichtigt, die *in vivo* Hybridisierungsstärke ab. Eine mögliche unspezifische Bindung von anderen zellulären humanen RNAs auf der gesamten oder teilweisen Länge der Oligonukleotide kann im *in vitro* Transkriptionssystem nicht abgebildet werden, da diese nicht vorliegen können. Da der Algorithmus nur auf den Daten des *in vitro* Transkriptionssystems basiert, würde es zu Signalverzerrungen im nukleären Run-on kommen, wenn der Anteil nichtspezifischer Bindungen hoch wäre. Andererseits liegen die Oligonukleotide stets im Überschuss vor.

Bei der Berechnung aller Variablen und des Korrekturfaktors wurde ein linearer Zusammenhang zwischen gemessener Signalintensität und tatsächlicher Hybridisierungsstärke angenommen. Der exponentielle Zerfall des eingesetzten Radionuklids hat damit Einfluss auf die gemessene Signalintensität. Von Beginn der Hybridisierung radioaktiv markierter RNA bis zur Analyse vergeht ein definierter Zeitraum. Bei schwacher Hybridisierung an die Oligonukleotide oder geringer Menge radioaktiv markierter RNA würde deren Signalintensität schneller in einen nichtmessbaren Bereich fallen als bei stark hybridisierenden Oligos. Das eingesetzte Phosphor-32 Radionuklid besitzt eine Halbwertszeit von ungefähr 14 Tagen. Daher scheint die Hybridisierungsdauer von maximal drei Tagen einen adäquaten Zeitraum darzustellen, um einen exzessiven Zerfall des Radionuklids und damit eine Verfälschung der Signalintensitäten zu vermeiden. Falls die

mittels Autoradiographie gemessene Signalintensität aus technischen Gründen außerhalb des Messbereichs liegt, kommt es zu einer Unterschätzung der Hybridisierungsstärke ab bestimmten Signalintensitäten.

4.2.3 Nukleärer Run-on und globale Run-on Sequenzierung (GRO-seq)

Die nukleäre Run-on Methode ermöglicht die Bestimmung der RNA-Polymeraseaktivität auf DNA-Abschnitten. Von der Polymerase generierte, radioaktiv markierte RNA wird dabei isoliert und an definierte DNA-Oligonukleotide hybridisiert, die Sequenzabschnitten von genomischer DNA entsprechen. Die Signalintensität korreliert mit der Dichte transkribierender Polymerasen auf der DNA.

Für die Membranhybridisierung wurden 130 pmol jedes DNA-Oligonukleotides, was einer durchschnittlichen Masse von 2 µg entspricht, immobilisiert. Daher ist es unwahrscheinlich, dass die Menge der generierten RNA-Moleküle diejenige der immobilisierten DNA-Oligos überschreitet und somit als limitierender Faktor für die gemessene Signalstärke ausscheidet. Zudem wären bei einer Mehrheit von nicht radioaktiv markierten gegenüber radioaktiv markierten RNA-Molekülen ausreichend DNA-Oligonukleotidmoleküle für eine Bindung dieser Minderheit vorhanden.

Während der Präparation der Zellkerne muss verhindert werden, dass Polymerasen reinitiierten, da sonst eine verfälschte Polymerasebeladung zu einem bestimmten Zeitpunkt gemessen wird. Dies wird durch eine unmittelbare und zügige Präparation der Kerne nach einem Waschschriff mit 4°C kaltem PBS erreicht. Die Präinitiationskomplexbildung wäre bei diesen Temperaturen deutlich verlängert. Das anschließende Auswaschen der Nukleotide und die limitierte Dauer der eigentlichen Run-on Reaktion von 60 Minuten tragen zur Messung von mehrheitlich aktiven elongierenden Polymerase bei.

Die globale Run-on Sequenzierung (GRO-seq) verbindet die Erfassung aktiv transkribierender Polymerase mit genomweiter, hochauflösender Sequenzierungstechnik. Transkribierte BrU-markierte RNA wird in eine cDNA-Bibliothek umgewandelt und sequenziert. Daraus ergibt sich eine vollständige Erfassung der RNA-Polymeraseaktivität auf einem Gen.

Dass die transkribierte RNA während des Run-ons und des GRO-seq enzymatisch prozessiert wird, kann nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden. Unter physiologischen Zuständen geschieht dies schon nach wenigen Sekunden [51]. Folglich würden bei intakter Prozessierungsmaschinerie nur die fertigen 18S, 5.8S und 28S rRNAs übrig bleiben, die herausgeschnittenen Abschnitte aber abgebaut werden und damit das Signal verloren gehen. Man würde eine höhere Signalintensität in den DNA-Abschnitten der späteren 18S, 5.8S und 28S rRNAs erwarten. Tatsächlich ist die Signalstärke dort deutlich höher als in den Abschnitten von 5'ETS, ITS1, ITS2 und 3'ETS. Dagegen sprechen die

vorhandenen Signale im 5'ETS und 3'ETS Bereich mit beiden Methoden sowie die heterogene Polymerasedichte im Bereich des 28S rDNA-Abschnittes (Abb. 14).

4.2.4 GC-abhängige Limitationen neuer Sequenzierungstechnologien

In den letzten Jahren ermöglichten neue Sequenzierungstechnologien die hochauflösende und massenhafte Bestimmung von DNA-Sequenzen. Davon abgeleitet kann auch RNA indirekt über die Umwandlung in cDNA sequenziert werden [224]. Gemeinsam ist diesen Technologien die Amplifikation von Einzelstrangnukleinsäuren durch Anheften von Linker-Oligonukleotiden und darauffolgender PCR. Die Daten der GRO-Seq-Experimente wurden mit einem Illumina/Solexa Genom-Analysegerät erhoben. Bei dieser Plattform werden zunächst die Enden der revers-transkribierten DNA-Fragmente der cDNA-Bibliothek mit speziellen Linker-Oligonukleotiden verbunden und in einer sogenannten Brückenamplifikation vermehrt. Jedes individuelle Einzelstrangfragment wird so innerhalb seines Clusters amplifiziert. Anschließend werden Linker-spezifische Primer, DNA-Polymerase und Nukleotide mit einer basenspezifischen Fluoreszenzmarkierung und chemisch veränderter 3'-OH-Gruppe zugefügt. Eine einzelne komplementäre Base wird in jedem Cluster inkorporiert. Aufgrund der veränderten 3'-OH-Gruppe können weitere Basen nicht angefügt werden. Dann erfolgt die Erfassung der Fluoreszenz der angefügten Base und damit die Sequenzbestimmung. Anschließend wird das geblockte 3'-Ende in einer chemischen Reaktion entfernt und ein neuer Zyklus kann beginnen. Dies ermöglicht das simultane Ablesen (*reads*) von tausenden Fragmenten mit einer Basenabfolge von jeweils ca. 25-35 Nukleotiden.

Diese Technik weist jedoch einige Limitationen hinsichtlich des GC-Gehaltes auf, die bei der Sequenzierung von rRNA-abgeleiteter cDNA eine Rolle spielen könnten. Zur Herstellung der cDNA wurden eine Reverse Transkriptase Reaktion sowie ein PCR-Amplifikationsschritt benötigt. GC-reiche Sequenzen bilden leichter unerwünschte Sekundärstrukturen und benötigen für eine adäquate Amplifikation höhere Schmelztemperaturen [225]. Bei fehlender Anpassung der Schmelztemperatur an den GC-Gehalt werden GC-reiche Sequenzen ineffizienter amplifiziert als AT-reiche. Für die neuen Hochdurchsatzsequenzierungstechnologien ist zudem ein systematischer GC-Gehalt-abhängiger Analysefehler (*GC content bias*) beschrieben worden [226]. Dieser führt zur Unterrepräsentation GC-armer Fragmente in den Sequenzierungsergebnissen.

Diese Effekte könnten für die unterschiedlichen Signalintensitäten und damit für die ungleiche Polymerasedichte entlang der rDNA mitverantwortlich sein, die in den GRO-Seq Experimenten gesehen wurden. Der durchschnittliche GC-Gehalt eines 100-kb Fragment des menschlichen Genoms kann zwischen 45 und 65% variieren [227]. Das 47S Primärtranskript der rRNA weist hingegen einen GC-Gehalt von 72% auf. Die 5'ETS (79%),

ITS1 (80%) , ITS2 (83%) und 3'ETS (83%) besitzen einen durchschnittlich höheren GC-Gehalt als die Abschnitte der späteren 18S (56%), 5.8S (57%) und 28S (69%) rRNA. Somit ergibt sich schon innerhalb der rDNA/rRNA eine deutliche Variabilität des GC-Gehaltes, der für Signalunterschiede verantwortlich sein könnte. Bei höherer Auflösung des GC-Gehaltes entlang der rDNA/rRNA-Sequenz zeigt sich beim Vergleich mit den Daten der GRO-Seq Experimente in den Abschnitten mit höherem GC-Gehalt eine schwächere Signalintensität und damit niedrigere Polymerasedichte (Abb. 17). Insbesondere wird dies innerhalb des Bereiches der späteren 28S deutlich. Dort wechseln sich GC-reiche Anteile mit geringer Signalintensität und GC-ärmere Anteile mit hoher Signalausprägung ab. Für die Daten des nukleären Run-ons ist dieser Zusammenhang geringer ausgeprägt (Abb. 18). Dort ist zumindest im Bereich der stärksten Signalintensität der 28S ein geringer GC-Gehalt zu erkennen.

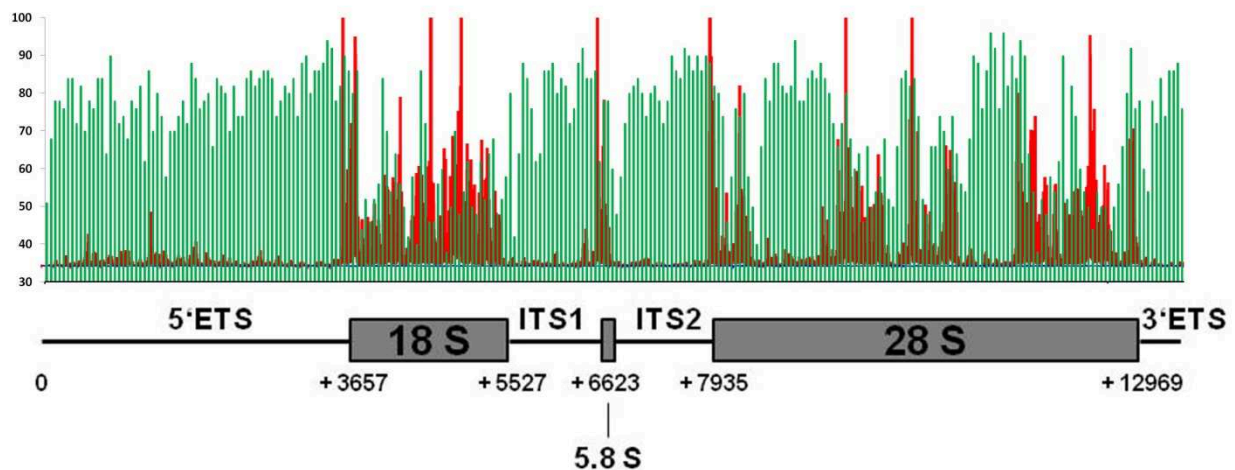


Abb. 17.: Superposition der GRO-seq-Daten mit dem GC-Gehalt entlang der rDNA/rRNA

Auf GRO-seq-Daten des rRNA-Genlocus wurde der korrespondierende GC-Gehalt projiziert. Die Abszisse entspricht der rDNA-Position relativ zum Transkriptionsstart (+1). Die Ordinate gibt die Anzahl der Sequenzierungstreffer pro Kilobase der DNA-Sequenz an (rote Säulen) sowie den GC-Gehalt der entsprechenden Sequenz in 50nt Schritten (grüne Säulen). Unterhalb des Diagramms wurde ein Schema des primären 47S rRNA-Transkriptes angefügt.

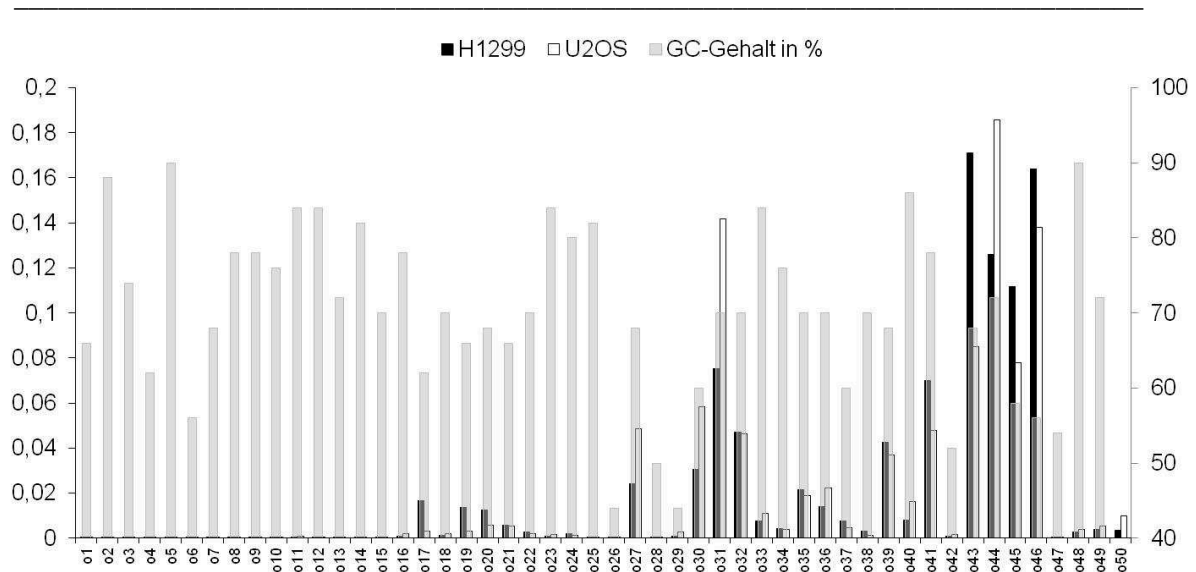


Abb. 18: Superposition der nukleären Run-on-Daten mit dem GC-Gehalt

Auf Daten des nukleären Run-ons des rRNA-Genlocus wurde der korrespondierende GC-Gehalt projiziert. Die Abszisse entspricht den einzelnen eingesetzten Oligonukleotiden. Die linke Ordinate gibt die relative Signalstärke des nukleären Run-ons aus U2OS (weiße Balken) und H1299 (schwarze Balken) Zellen an. Die rechte Ordinate zeigt den GC-Gehalt der entsprechenden Oligonukleotidsequenz an (graue Balken). Für die Zuordnung der einzelnen Oligonukleotide zu den Sequenzabschnitten des Primärtranskriptes siehe Abb. 11 und 12.

4.3 Literaturvergleich

4.3.1 Verteilung der RNA-Polymerase I und assoziierter Proteine auf rDNA

Daten über die Verteilung transkribierender RNA Polymerase I in menschlichen Zellen liegen nur in geringer Auflösung vor. Eine Visualisierung transkribierter Gene in eukaryoten Zellen kann mittels nukleärem *Spreading* (sogenannte *Miller spreads*) von Chromatin erreicht werden. Chromatin der rDNA wird hierbei elektronenmikroskopisch dargestellt. Auf der rDNA erkennt man dabei Verdichtungen, die Pol I Molekülen entsprechen. Von den Pol I gehen seitlich die naszierenden rRNA-Moleküle ab. *Miller spreads* aus Hefezellen zeigen eine heterogene, aber nicht zufällige Verteilung der Pol I [218]. Insbesondere im 5'ETS Bereich und jenseits der 25S (die Hefevariante der 28S) finden sich nur wenige Pol I. In den 18S, 5.8S und 25S Bereichen liegen die Pol I in Gruppen vor [205, 208, 209, 215, 219, 222, 228]. Eine exakte Positionsbestimmung und der Vergleich mit unseren erhobenen nukleären Run-on und GRO-Seq Daten ist aufgrund der geringeren Auflösung nicht möglich. Die Polymerasedichte ist in Hefezellen zudem abhängig von der Anzahl der rDNA-Wiederholungseinheiten im Genom. Hefestämme mit reduzierter Anzahl von rDNA-Wiederholungseinheiten weisen eine erhöhte Dichte von Pol I auf [218]. Aufgrund der komplexeren Chromatinstruktur und damit verbundenen technischen Schwierigkeiten sind

Miller spreads aus menschlichen Zellen nur in unzureichender Qualität zu gewinnen [223, 229].

Chromatinimmunpräzipitationsexperimente (ChIP) mit Pol I spezifischen Antikörpern weisen Pol I Moleküle unabhängig von ihrem Aktivitätsstadium auf bestimmten rDNA-Abschnitten nach. Auch hier finden sich in der Literatur keine hochauflösenden Daten über die Position von Pol I auf der humanen rDNA. Zumindest konnte für größere Sequenzabschnitte eine Bindung von Pol I im 47S-kodierenden und nichtkodierenden, intergenen Bereich nachgewiesen werden [230]. Daten aus Hefezellen zeigen eine erhöhte Pol I Bindung im Bereich der 18S, 5.8S und 25S im Vergleich zu intergenen Bereichen und dem Promotor. In Mauszellen ergibt sich ein ähnliches Bild mit stärkerer Bindung im prä-rRNA Bereich als in intergenen Bereichen. Eine Ausnahme bildet der Enhancer/Promotorbereich, der im Gegensatz zur Hefezelle eine erhöhte Pol I Besetzung aufweist [214, 231].

Über die Verteilung von Pol I assoziierten Proteinen liegen nur wenige Daten vor. Die Position von UBF1 auf der rDNA unterscheidet sich zumindest in der Maus deutlich von der Position transkribierender Pol I. UBF1 bindet lückenlos über den späteren 47S RNA-Bereich im Vergleich zu den GRO-Seq Daten der Pol I. Innerhalb des 47S finden sich unterschiedliche Signalstärken. Außerhalb dieses Bereiches bindet UBF1 interessanterweise stark im Promotor- und Enhancerbereich vor dem Transkriptionsstart und nur schwach im sonstigen intergenen Bereich [216]. ChIP-Experimente mit humanem UBF1 wiesen in allen untersuchten Sequenzabschnitten der rDNA eine Bindung mit unterschiedlicher Signalstärke nach, entlang der 47S ebenso wie im intergenen Bereich [190]. Für die humanen t-Utp Proteine liegen Daten aus ChIP-Experimenten in geringer räumlicher Auflösung mit einer des humanen UBF1 ähnlichen Verteilung vor [170]. Vermutlich beeinflussen sowohl UBF1 als auch die t-Utp Proteine die Transkriptionsaktivität der Pol I entlang der gesamten 47S. Darüber hinaus scheinen sie auch im intergenen Bereich eine bis jetzt unbekannte Rolle auszufüllen und speziesspezifische Unterschiede ihres Bindungsmuster aufzuweisen.

4.3.2 Kotranskriptionelle Prozessierung und Basenmodifikation der rRNA

Ribosomale RNA wird in Eukaryoten intensiv enzymatisch modifiziert und prozessiert [232]. Dies geschieht ko- und posttranskriptionell. Der Nachweis der kotranskriptionellen Methylierung und ihrer Bedeutung für die weitere Prozessierung der humanen rRNA und Ribosomenfunktion gelang vor über 45 Jahren [233-235]. Methylierungen der rRNA wurden dabei erstmals durch Zugabe von radioaktiv markiertem [Methyl-¹⁴C]-Methionin nachverfolgt, das als Quelle für Methylgruppen diente. Mittels RNA-Fingerprinting und T1-Endonukleaseverdau konnten die Anzahl und Art der an 2'-OH-Ribose methylierten

Nukleotiden ermittelt werden. Die Bestimmung der Position erfolgte durch den Vergleich der RNA-Sequenz mit den damals vorhandenen rDNA-Sequenzen [236, 237].

Die Visualisierung der kotranskriptionellen Kompaktierung der naszierenden rRNA gelang mittels *Miller spreads* aus Hefezellen. Wenn die Pol I das Ende des 18S-rDNA-Abschnitts erreicht, zeigt sich eine Verkürzung und Verdichtung der transkribierten RNA [215]. Weiter distal zur Mitte der 25S-rDNA verschwindet plötzlich ein Teil der naszierenden rRNA, was ein kotranskriptionelles Abtrennen vermuten lässt. Dies korrespondiert mit der geringen Halbwertszeit der 5'ETS von wenigen Sekunden in Hefezellen [238]. Eine umfassende Analyse der Kinetik von *pulse-labeling* Experimenten mit [5,6-³H]-Uracil-markierten rRNAs ergab in Hefezellen einen Anteil kotranskriptioneller Prozessierungsschnitte von ca. 70% an der Gesamtzahl der Transkripte. Methylierungen wurden in dieser Studie durch Zugabe von radioaktivem [Methyl-³H]-Methionin dargestellt. Die Methylierungen der späteren SSU prä-rRNA werden nahezu vollständig, die der LSU prä-rRNA nur partiell kotranskriptionell eingefügt [51]. Aufgrund von UV-Crosslinking-Experimenten weiß man, dass snoRNPs und RNA-Helikasen an vielen Positionen der prä-rRNA binden und dort Basenmodifikationen durchführen. Ob Pseudouridinylierungen unmittelbar kotranskriptionell oder nur verzögert an abgetrennten Transkripten stattfindet, ist bisher nicht eindeutig nachgewiesen [239, 240].

Bis jetzt wurden die humanen Modifikationspositionen nur innerhalb der späteren 18S, 5.8S und 28S nachgewiesen. Das Radioaktivitätsmuster von [Methyl-³H]-Methionin-markierter 45S rRNA entsprach demjenigen von [Methyl-¹⁴C]-Methionin-markierten reifen 18S und 28S rRNAs in frühen Experimenten der sechziger Jahre [233]. Zudem war das Fingerprinting-Muster von T1-RNase/RNase A Verdau der 45S und 18S/28S rRNA weitestgehend identisch [241]. Spätere Sequenzierungstechniken lokalisierten die Modifikationen letztlich nur innerhalb der kodierenden Regionen [242]. Interessanterweise finden sich die Modifikationen mehrheitlich in den spezieübergreifend konservierten Sequenzabschnitten der rRNA und nicht in den weniger konservierten, GC-reicheren Sequenzen. Eine Einschränkung der Aussagekraft dieser Daten muss hinsichtlich der Dauer der [Methyl-¹⁴C]-Methionin-Inkubation angemerkt werden. In der bis dahin genauesten Bestimmung der Modifikationsposition wurden für die Markierung von nukleolärer 45S rRNA HeLa-Zellen für 90 Minuten mit [Methyl-¹⁴C]-Methionin inkubiert, für die zytoplasmatische 18S/28S rRNA 48 Stunden [241]. Aufgrund der schnellen Prozessierung der 45S zu den reiferen rRNA Spezies und dem raschen Abbau der Spacer-Sequenzen sind Nukleotidmodifikationen letzterer Abschnitte nicht sicher auszuschließen [51].

Dass Transkription und Prozessierung funktionell gekoppelt sind, zeigen Experimente mit einer mutierten, dysfunktionalen Polymerase I Untereinheit. Die Hefezellen haben eine reduzierte Transkriptionsrate und akkumulieren nichtprozessierte, aberrante rRNA-Vorstufen. Ob ein Teilschritt der Pol I Transkription wie Initiation oder Elongation die funktionelle

Kopplung stärker beeinflusst, konnte noch nicht abschließend geklärt werden. Die Bedeutung der t-Utp Proteine für sowohl Pol I Transkription als auch rRNA Prozessierung, konnte hingegen in Hefe- und humanen HeLa-Zellen gezeigt werden [170, 222].

4.4 Schlussfolgerung

Die Einteilung der Transkription mRNA-codierender Gene durch RNA-Polymerase II gemäß publizierten GRO-seq Daten erfolgt nach zwei Kriterien: ob ein promotornahes Pausieren (*promoter proximal pausing*) der Polymerase vorliegt und ob das Gen aktiv transkribiert wird. Daraus ergeben sich vier verschiedene Klassen von Genen [213].

Die Verteilung der RNA-Polymerase I auf ribosomaler DNA fügt sich nicht in dieses Muster. Promotornahes Pausieren mit Vorhandensein einer deutlichen Signalspitze kurz nach Transkriptionsstart konnte sowohl im nukleären Run-on als auch im GRO-seq für Pol I nicht nachgewiesen werden. Auch die für viele Gene beschriebene divergierende Transkriptionsrichtung zeigte sich nicht in den GRO-seq Daten. Stattdessen konnten wir auf ribosomaler DNA eine heterogene Verteilung aktiver Pol I nachweisen. Hohe Signallevel im Bereich der späteren 18S, 5.8S und 28S rRNA sowie im Bereich von Basenmodifikationen sprechen für eine Verbindung von Pol I Transkription mit kotranskriptioneller rRNA-Prozessierung und -Modifikation. Die Aussagekraft der Polymerasedichte auf Basis der GRO-Seq Daten wird durch mögliche GC-abhängige Verzerrung der Signalintensitäten eingeschränkt. Die Signalintensität GC-reicher Sequenzen wird dadurch unterschätzt. Aufgrund der GC-unabhängigen Darstellung der Transkriptionsaktivität mittels nukleärem Run-on können wir dennoch eine heterogene Verteilung der Pol I feststellen.

Die Verteilung der Pol I spiegelt daher die komplexe Regulation der Ribosomenbiogenese wider. Proteinkodierende Gene werden transkribiert und die mRNA anschließend translatiert. Die von Pol I generierte rRNA muss hingegen in das große Makromolekül des Ribosoms, bestehend aus vielen Einzelproteinen und rRNA, eingebaut werden. Die Untereinheiten des Ribosoms werden schon im Zellkern weitestgehend fertiggestellt. Es erscheint sinnvoll, dass naszierende rRNA kotranskriptionell bearbeitet wird, um möglichst frühzeitig eine intakte Untereinheit fertigstellen zu können. Eine nahtlose Produktionslinie von ribosomaler RNA über Ribonukleoproteinintermediate bis hin zur fertigen ribosomalen Untereinheit könnte auch die hohe Ribosomenproduktionsrate erklären. Wie in einer hocheffizienten Fabrik werden mehrere Teilprozesse (Produktion von rRNA und ribosomalen Proteinen) durch Steuerelemente (u.a. Transkriptionsfaktoren, Prozessierungsenzyme, snoRNAs, Topoisomerasen) zusammengeführt. Die Aktivität der RNA-Polymerase I als Produzent von ca. 60% der zellulären RNA muss kontrolliert werden. Eine Deregulation der rRNA-Produktion würde den gesamten RNA-Metabolismus und folglich zentrale Zellfunktionen

destabilisieren. Die Konsequenzen könnten Zelltod, gestörte zelluläre Regeneration oder maligne Transformation sein.

5 Zusammenfassung

Für Wachstum und Proliferation benötigen normale und maligne Zellen große Mengen an Proteinen. Diese werden von Ribosomen produziert. Die Herstellung der Ribosomen, die Ribosomenbiogenese, wird vor allem über die Generierung ribosomaler RNA (rRNA) reguliert. Die rRNA stellt den größten Anteil der Zell-RNA dar und wird mit Ausnahme der 5S-rRNA durch die RNA-Polymerase I (Pol I) generiert.

Die vorliegende Arbeit erfasst erstmalig in größerem Umfang die Verteilung transkribierender Pol I Moleküle auf humaner rDNA, um Ebenen der Transkriptionsregulation und eine mögliche Kopplung von Teilprozessen der Ribosomenbiogenese zu untersuchen. Die nukleäre Run-on Methode basiert auf der Hybridisierung radioaktiv markierter, transkribierter rRNA an sequenzspezifische DNA-Oligonukleotide (Oligos) von 50 Nukleotiden Länge. Die globale Run-on Sequenzierung (GRO-seq) wandelt nascente BrU-markierte rRNA durch eine Reverse Transkriptase in eine DNA-Bank um, sequenziert diese und ermöglicht ein hochauflösendes Abbild der Transkriptionsaktivität. Mittels nukleärem Run-on und zur Verfügung gestellten Daten aus GRO-seq-Experimenten sind Aussagen über Position und Konzentration aktiver Polymerasen möglich. Aufgrund des heterogenen GC-Gehaltes der rDNA und folglich der transkribierten rRNA sind die Hybridisierungsintensitäten an die revers-komplementären Oligos bei einer gewählten Hybridisierungstemperatur nicht vergleichbar. Demzufolge wird ein Korrekturalgorithmus für die Hybridisierungsstärke der verwendeten Oligos an die ribosomale RNA im nukleären Run-on angewendet. In einem *in vitro* Transkriptionssystem werden die Intensitäten der einzelnen Oligo-rRNA Hybridisierungen ermittelt und später zur Errechnung der tatsächlichen Hybridisierungsstärke verwendet. Von einem linearisierten DNA-Vektor transkribiert eine T7-RNA-Polymerase eine ca. 2,5 kb lange RNA, die hintereinander positionierte, revers-komplementäre Sequenzen der Oligos enthält. Bei konstantem Verhältnis der Oligo- und *in vitro* RNA-Konzentrationen sowie einer festgelegten Hybridisierungstemperatur erfasst man die GC-abhängige Hybridisierungsstärke.

Die Ergebnisse aus korrigiertem nukleären Run-on und GRO-seq in humanen Zellen weisen eine heterogene Verteilung der RNA-Polymerase I entlang der rDNA nach. Im Bereich des Promotors und des Transkriptionsstarts finden sich wenige transkribierende Polymerasen. In Abschnitten, die für die späteren 18S, 5.8S und 28S rRNA kodieren, konzentrieren sich hingegen transkribierende Polymerasen. Modifikationspositionen der rRNA, die im reifen Ribosom Pseudouridinylierungen oder Methylierungen aufweisen, befinden sich fast ausschließlich in Bereichen mit hoher Pol I Konzentration. Eine sichere Aussage über die Pol I Verteilung ist zumindest aus den GRO-Seq-Daten aufgrund der GC-abhängigen Verzerrung der Signalintensitäten nicht zu treffen. Hingegen bildet der nukleäre Run-on GC-unabhängig

die Transkriptionsaktivität auf der rDNA ab. RNA-Polymerase II transkribierte Gene besitzen eine andere Verteilung transkribierender Polymerasen. Entweder konzentrieren sich aktive Pol II promotornah (*promoter proximal pausing*) oder sind gleichmäßig über das Gen verteilt. Zudem wird auf Pol II transkribierten Genen oft eine divergierende Transkriptionsrichtung beobachtet. Aufgrund des promotornahen Pausierens der Pol II wird für diese Gene eine Transkriptionsregulation auf Ebene der Initiation diskutiert. Da die vorliegenden Daten kein promotornahes Pausieren der Pol I feststellen, hingegen eine heterogene Verteilung im weiteren Verlauf der rDNA, postulieren wir die Elongation als wichtige Ebene der Pol I Regulation. Da Prozessierung und Modifikation bereits an der naszierenden rRNA stattfinden, erscheint eine Kopplung der Pol I Transkriptionsaktivität mit der Modifikations- und Prozessierungsmaschinerie sinnvoll. So könnte durch Qualitätskontrollen sichergestellt werden, dass nur korrekt modifizierte rRNA weiterprozessiert wird. Wenn die rRNA von der Pol I vollständig transkribiert wurde, könnte die rRNA aufgrund der schon stattgefundenen kotranskriptionellen Modifikation sofort für die Zusammensetzung des Ribosoms zur Verfügung stehen. Die Kopplung der Elongationsaktivität mit kotranskriptioneller Prozessierung/Modifikation ermöglicht die hohe Effizienz und Produktionsrate der Pol I, die für die Generierung von 60% der gesamten zellulären RNA verantwortlich ist. Eine Steigerung oder Verminderung der Pol I Transkriptionsaktivität würde zu weitreichenden Änderungen des RNA-Metabolismus und, über den Einfluss auf die Ribosomenbiogenese, des Proteoms der Zelle führen.

Bestimmte bösartige Tumoren weisen Mutationen in Komponenten der Ribosomenbiogenese und speziell der Pol I Transkriptionsmaschinerie auf, die zu defekter rRNA und Ribosomen führen. In anderen Krebsarten ist durch erhöhte Aktivität der Pol I das Potential für Zellwachstum, -teilung und -metastasierung gesteigert. Daher rückt die Ribosomenbiogenese und speziell die Pol I in den Fokus pharmakologischer Tumorthherapie. Substanzen mit Anti-Pol I Aktivität befinden sich bereits in klinischen Studien zur Therapie von soliden Krebsarten. Beispielsweise wäre in Krebszellen mit aktiviertem c-Myc eine Inhibition der Ribosomenbiogenese sinnvoll, da c-Mycs onkogenes Potential maßgeblich auf der Steigerung der Ribosomenbiogenese beruht. Zudem würde die Inhibition der Ribosomenbiogenese den Tumorsuppressor p53 aktivieren und zur Apoptose der Zellen führen. Jedoch wären Effekte auf gesunde Zellen nicht auszuschließen. Die Herausforderung besteht darin, einen Teilprozess der Ribosomenbiogenese zu finden, dessen Inhibition in gesunden Zellen für einen bestimmten Therapiezeitraum tolerabel ist.

6 Literaturverzeichnis

1. Van Pelt, R., *Forest giants of the pacific coast*. 2001, Vancouver San Francisco Seattle London: Global forest Society University of Washington Press. XXIV-200.
2. Junglas, B., et al., *Ignicoccus hospitalis* and *Nanoarchaeum equitans*: ultrastructure, cell-cell interaction, and 3D reconstruction from serial sections of freeze-substituted cells and by electron cryotomography. *Arch Microbiol*, 2008. **190**(3): p. 395-408.
3. Edgar, B.A., *How flies get their size: genetics meets physiology*. *Nat Rev Genet*, 2006. **7**(12): p. 907-16.
4. Bernstein, K.A., et al., *Ribosome biogenesis is sensed at the Start cell cycle checkpoint*. *Mol Biol Cell*, 2007. **18**(3): p. 953-64.
5. Thomas, G., *An encore for ribosome biogenesis in the control of cell proliferation*. *Nat Cell Biol*, 2000. **2**(5): p. E71-2.
6. Skog, S. and E. Eliasson, *Correlation between cell size and position within the division cycle in suspension cultures of Chang liver cells*. *Cell Tissue Kinet*, 1979. **12**(5): p. 501-11.
7. Martin, S.G. and M. Berthelot-Grosjean, *Polar gradients of the DYRK-family kinase Pom1 couple cell length with the cell cycle*. *Nature*, 2009. **459**(7248): p. 852-6.
8. Moseley, J.B., et al., *A spatial gradient coordinates cell size and mitotic entry in fission yeast*. *Nature*, 2009. **459**(7248): p. 857-60.
9. Jorgensen, P., et al., *A dynamic transcriptional network communicates growth potential to ribosome synthesis and critical cell size*. *Genes Dev*, 2004. **18**(20): p. 2491-505.
10. Mayer, C. and I. Grummt, *Ribosome biogenesis and cell growth: mTOR coordinates transcription by all three classes of nuclear RNA polymerases*. *Oncogene*, 2006. **25**(48): p. 6384-91.
11. Warner, J.R., *The economics of ribosome biosynthesis in yeast*. *Trends Biochem Sci*, 1999. **24**(11): p. 437-40.
12. Amaldi, F. and P. Pierandrei-Amaldi, *TOP genes: a translationally controlled class of genes including those coding for ribosomal proteins*. *Prog Mol Subcell Biol*, 1997. **18**: p. 1-17.
13. Piekna-Przybylska, D., W.A. Decatur, and M.J. Fournier, *The 3D rRNA modification maps database: with interactive tools for ribosome analysis*. *Nucleic Acids Res*, 2008. **36**(Database issue): p. D178-83.
14. Nakao, A., M. Yoshihama, and N. Kenmochi, *RPG: the Ribosomal Protein Gene database*. *Nucleic Acids Res*, 2004. **32**(Database issue): p. D168-70.
15. Warner, J.R. and K.B. McIntosh, *How common are extraribosomal functions of ribosomal proteins?* *Mol Cell*, 2009. **34**(1): p. 3-11.
16. Drakas, R., X. Tu, and R. Baserga, *Control of cell size through phosphorylation of upstream binding factor 1 by nuclear phosphatidylinositol 3-kinase*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(25): p. 9272-6.
17. Efstratiadis, A., *Genetics of mouse growth*. *Int J Dev Biol*, 1998. **42**(7): p. 955-76.
18. Edgar, B.A., *From small flies come big discoveries about size control*. *Nat Cell Biol*, 1999. **1**(8): p. E191-3.
19. Montagne, J., et al., *Drosophila S6 kinase: a regulator of cell size*. *Science*, 1999. **285**(5436): p. 2126-9.
20. Lambertsson, A., *The minute genes in Drosophila and their molecular functions*. *Adv Genet*, 1998. **38**: p. 69-134.
21. Volarevic, S., et al., *Proliferation, but not growth, blocked by conditional deletion of 40S ribosomal protein S6*. *Science*, 2000. **288**(5473): p. 2045-7.
22. Schwab, M.S., et al., *p70(S6K) controls selective mRNA translation during oocyte maturation and early embryogenesis in Xenopus laevis*. *Mol Cell Biol*, 1999. **19**(4): p. 2485-94.

23. Conlon, I. and M. Raff, *Size control in animal development*. Cell, 1999. **96**(2): p. 235-44.
24. Tschochner, H. and E. Hurt, *Pre-ribosomes on the road from the nucleolus to the cytoplasm*. Trends Cell Biol, 2003. **13**(5): p. 255-63.
25. Derenzini, M., F. Farabegoli, and D. Trere, *Relationship between interphase AgNOR distribution and nucleolar size in cancer cells*. Histochem J, 1992. **24**(12): p. 951-6.
26. Mayer, C. and I. Grummt, *Cellular stress and nucleolar function*. Cell Cycle, 2005. **4**(8): p. 1036-8.
27. Hiscox, J.A., *The nucleolus--a gateway to viral infection?* Arch Virol, 2002. **147**(6): p. 1077-89.
28. Maggi, L.B., Jr. and J.D. Weber, *Nucleolar adaptation in human cancer*. Cancer Invest, 2005. **23**(7): p. 599-608.
29. Johnson, F.B., R.A. Marciniak, and L. Guarente, *Telomeres, the nucleolus and aging*. Curr Opin Cell Biol, 1998. **10**(3): p. 332-8.
30. Olson, M.O., K. Hingorani, and A. Szebeni, *Conventional and nonconventional roles of the nucleolus*. Int Rev Cytol, 2002. **219**: p. 199-266.
31. Raska, I., P.J. Shaw, and D. Cmarko, *Structure and function of the nucleolus in the spotlight*. Curr Opin Cell Biol, 2006. **18**(3): p. 325-34.
32. Andersen, J.S., et al., *Nucleolar proteome dynamics*. Nature, 2005. **433**(7021): p. 77-83.
33. Boisvert, F.M., et al., *The multifunctional nucleolus*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(7): p. 574-85.
34. Leung, A.K., et al., *Quantitative kinetic analysis of nucleolar breakdown and reassembly during mitosis in live human cells*. J Cell Biol, 2004. **166**(6): p. 787-800.
35. Dundr, M., et al., *Location of the HIV-1 Rev protein during mitosis: inactivation of the nuclear export signal alters the pathway for postmitotic reentry into nucleoli*. J Cell Sci, 1996. **109** (Pt 9): p. 2239-51.
36. Savino, T.M., et al., *Nucleolar assembly of the rRNA processing machinery in living cells*. J Cell Biol, 2001. **153**(5): p. 1097-110.
37. Maden, B.E. and J.M. Hughes, *Eukaryotic ribosomal RNA: the recent excitement in the nucleotide modification problem*. Chromosoma, 1997. **105**(7-8): p. 391-400.
38. Gustafsson, C., et al., *Identification of new RNA modifying enzymes by iterative genome search using known modifying enzymes as probes*. Nucleic Acids Res, 1996. **24**(19): p. 3756-62.
39. Ofengand, J. and A. Bakin, *Mapping to nucleotide resolution of pseudouridine residues in large subunit ribosomal RNAs from representative eukaryotes, prokaryotes, archaeobacteria, mitochondria and chloroplasts*. J Mol Biol, 1997. **266**(2): p. 246-68.
40. Smit, S., J. Widmann, and R. Knight, *Evolutionary rates vary among rRNA structural elements*. Nucleic Acids Res, 2007. **35**(10): p. 3339-54.
41. Ofengand, J., *Ribosomal RNA pseudouridines and pseudouridine synthases*. FEBS Lett, 2002. **514**(1): p. 17-25.
42. Kiss, T., *Small nucleolar RNA-guided post-transcriptional modification of cellular RNAs*. EMBO J, 2001. **20**(14): p. 3617-22.
43. Cavaille, J., M. Nicoloso, and J.P. Bachellerie, *Targeted ribose methylation of RNA in vivo directed by tailored antisense RNA guides*. Nature, 1996. **383**(6602): p. 732-5.
44. Kiss-Laszlo, Z., et al., *Site-specific ribose methylation of preribosomal RNA: a novel function for small nucleolar RNAs*. Cell, 1996. **85**(7): p. 1077-88.
45. Ganot, P., M.L. Bortolin, and T. Kiss, *Site-specific pseudouridine formation in preribosomal RNA is guided by small nucleolar RNAs*. Cell, 1997. **89**(5): p. 799-809.
46. Kiss, T., E. Fayet-Lebaron, and B.E. Jady, *Box H/ACA small ribonucleoproteins*. Mol Cell, 2010. **37**(5): p. 597-606.
47. Rozhdestvensky, T.S., et al., *Binding of L7Ae protein to the K-turn of archaeal snoRNAs: a shared RNA binding motif for C/D and H/ACA box snoRNAs in Archaea*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(3): p. 869-77.

48. Bleichert, F. and S.J. Baserga, *Dissecting the role of conserved box C/D sRNA sequences in di-sRNP assembly and function*. Nucleic Acids Res, 2010. **38**(22): p. 8295-305.
49. Dez, C. and D. Tollervey, *Ribosome synthesis meets the cell cycle*. Curr Opin Microbiol, 2004. **7**(6): p. 631-7.
50. Dez, C., et al., *Npa1p, a component of very early pre-60S ribosomal particles, associates with a subset of small nucleolar RNPs required for peptidyl transferase center modification*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(14): p. 6324-37.
51. Kos, M. and D. Tollervey, *Yeast pre-rRNA processing and modification occur cotranscriptionally*. Mol Cell, 2010. **37**(6): p. 809-20.
52. Decatur, W.A., et al., *Identifying effects of snoRNA-guided modifications on the synthesis and function of the yeast ribosome*. Methods Enzymol, 2007. **425**: p. 283-316.
53. Piekna-Przybylska, D., W.A. Decatur, and M.J. Fournier, *New bioinformatic tools for analysis of nucleotide modifications in eukaryotic rRNA*. RNA, 2007. **13**(3): p. 305-12.
54. King, T.H., et al., *Ribosome structure and activity are altered in cells lacking snoRNPs that form pseudouridines in the peptidyl transferase center*. Mol Cell, 2003. **11**(2): p. 425-35.
55. Liang, X.H., Q. Liu, and M.J. Fournier, *rRNA modifications in an intersubunit bridge of the ribosome strongly affect both ribosome biogenesis and activity*. Mol Cell, 2007. **28**(6): p. 965-77.
56. Liang, X.H., Q. Liu, and M.J. Fournier, *Loss of rRNA modifications in the decoding center of the ribosome impairs translation and strongly delays pre-rRNA processing*. RNA, 2009. **15**(9): p. 1716-28.
57. Esguerra, J., J. Warringer, and A. Blomberg, *Functional importance of individual rRNA 2'-O-ribose methylations revealed by high-resolution phenotyping*. RNA, 2008. **14**(4): p. 649-56.
58. Bally, M., J. Hughes, and G. Cesareni, *SnR30: a new, essential small nuclear RNA from Saccharomyces cerevisiae*. Nucleic Acids Res, 1988. **16**(12): p. 5291-303.
59. Hughes, D., J.F. Atkins, and S. Thompson, *Mutants of elongation factor Tu promote ribosomal frameshifting and nonsense readthrough*. EMBO J, 1987. **6**(13): p. 4235-9.
60. Zagorski, J., D. Tollervey, and M.J. Fournier, *Characterization of an SNR gene locus in Saccharomyces cerevisiae that specifies both dispensible and essential small nuclear RNAs*. Mol Cell Biol, 1988. **8**(8): p. 3282-90.
61. Schmitt, M.E. and D.A. Clayton, *Nuclear RNase MRP is required for correct processing of pre-5.8S rRNA in Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell Biol, 1993. **13**(12): p. 7935-41.
62. Boulon, S., et al., *The nucleolus under stress*. Mol Cell, 2010. **40**(2): p. 216-27.
63. Levine, A.J., *p53, the cellular gatekeeper for growth and division*. Cell, 1997. **88**(3): p. 323-31.
64. Prives, C., *Signaling to p53: breaking the MDM2-p53 circuit*. Cell, 1998. **95**(1): p. 5-8.
65. Bertwistle, D., M. Sugimoto, and C.J. Sherr, *Physical and functional interactions of the Arf tumor suppressor protein with nucleophosmin/B23*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(3): p. 985-96.
66. Rubbi, C.P. and J. Milner, *Disruption of the nucleolus mediates stabilization of p53 in response to DNA damage and other stresses*. EMBO J, 2003. **22**(22): p. 6068-77.
67. Burger, K., et al., *Chemotherapeutic drugs inhibit ribosome biogenesis at various levels*. J Biol Chem, 2010. **285**(16): p. 12416-25.
68. Chen, D., et al., *Ribosomal protein S7 as a novel modulator of p53-MDM2 interaction: binding to MDM2, stabilization of p53 protein, and activation of p53 function*. Oncogene, 2007. **26**(35): p. 5029-37.
69. Fumagalli, S., et al., *Absence of nucleolar disruption after impairment of 40S ribosome biogenesis reveals an rpL11-translation-dependent mechanism of p53 induction*. Nat Cell Biol, 2009. **11**(4): p. 501-8.
70. Zhu, Y., et al., *Ribosomal protein S7 is both a regulator and a substrate of MDM2*. Mol Cell, 2009. **35**(3): p. 316-26.

71. Sun, X.X., M.S. Dai, and H. Lu, *Mycophenolic acid activation of p53 requires ribosomal proteins L5 and L11*. J Biol Chem, 2008. **283**(18): p. 12387-92.
72. Yuan, X., et al., *Genetic inactivation of the transcription factor TIF-IA leads to nucleolar disruption, cell cycle arrest, and p53-mediated apoptosis*. Mol Cell, 2005. **19**(1): p. 77-87.
73. Freed, E.F., et al., *When ribosomes go bad: diseases of ribosome biogenesis*. Mol Biosyst, 2010. **6**(3): p. 481-93.
74. Narla, A. and B.L. Ebert, *Ribosomopathies: human disorders of ribosome dysfunction*. Blood, 2010. **115**(16): p. 3196-205.
75. Jones, N.C., et al., *Prevention of the neurocristopathy Treacher Collins syndrome through inhibition of p53 function*. Nat Med, 2008. **14**(2): p. 125-33.
76. Chakraborty, A., et al., *Loss of ribosomal protein L11 affects zebrafish embryonic development through a p53-dependent apoptotic response*. PLoS One, 2009. **4**(1): p. e4152.
77. Uechi, T., et al., *Ribosomal protein gene knockdown causes developmental defects in zebrafish*. PLoS One, 2006. **1**: p. e37.
78. McGowan, K.A., et al., *Ribosomal mutations cause p53-mediated dark skin and pleiotropic effects*. Nat Genet, 2008. **40**(8): p. 963-70.
79. Draptchinskaia, N., et al., *The gene encoding ribosomal protein S19 is mutated in Diamond-Blackfan anaemia*. Nat Genet, 1999. **21**(2): p. 169-75.
80. Dauwerse, J.G., et al., *Mutations in genes encoding subunits of RNA polymerases I and III cause Treacher Collins syndrome*. Nat Genet, 2011. **43**(1): p. 20-2.
81. Parlato, R., et al., *Activation of an endogenous suicide response after perturbation of rRNA synthesis leads to neurodegeneration in mice*. J Neurosci, 2008. **28**(48): p. 12759-64.
82. Rieker, C., et al., *Nucleolar disruption in dopaminergic neurons leads to oxidative damage and parkinsonism through repression of mammalian target of rapamycin signaling*. J Neurosci, 2011. **31**(2): p. 453-60.
83. Kalita, K., et al., *Inhibition of nucleolar transcription as a trigger for neuronal apoptosis*. J Neurochem, 2008. **105**(6): p. 2286-99.
84. Nagasao, J., et al., *Relationship between ribosomal RNA gene transcription activity and motoneuron death: observations of avulsion and axotomy of the facial nerve in rats*. J Neurosci Res, 2008. **86**(2): p. 435-42.
85. Pietrzak, M., et al., *Epigenetic Silencing of Nucleolar rRNA Genes in Alzheimer's Disease*. PLoS One, 2011. **6**(7): p. e22585.
86. Barlow, J.L., et al., *A p53-dependent mechanism underlies macrocytic anemia in a mouse model of human 5q- syndrome*. Nat Med, 2010. **16**(1): p. 59-66.
87. Dutt, S., et al., *Haploinsufficiency for ribosomal protein genes causes selective activation of p53 in human erythroid progenitor cells*. Blood, 2011. **117**(9): p. 2567-76.
88. Ebert, B.L., et al., *Identification of RPS14 as a 5q- syndrome gene by RNA interference screen*. Nature, 2008. **451**(7176): p. 335-9.
89. Nousbeck, J., et al., *Alopecia, neurological defects, and endocrinopathy syndrome caused by decreased expression of RBM28, a nucleolar protein associated with ribosome biogenesis*. Am J Hum Genet, 2008. **82**(5): p. 1114-21.
90. Boocock, G.R., et al., *Mutations in SBDS are associated with Shwachman-Diamond syndrome*. Nat Genet, 2003. **33**(1): p. 97-101.
91. Ganapathi, K.A., et al., *The human Shwachman-Diamond syndrome protein, SBDS, associates with ribosomal RNA*. Blood, 2007. **110**(5): p. 1458-65.
92. Rujkijyanont, P., et al., *Bone marrow cells from patients with Shwachman-Diamond syndrome abnormally express genes involved in ribosome biogenesis and RNA processing*. Br J Haematol, 2009. **145**(6): p. 806-15.
93. Shwachman, H., et al., *The Syndrome of Pancreatic Insufficiency and Bone Marrow Dysfunction*. J Pediatr, 1964. **65**: p. 645-63.
94. Armistead, J., et al., *Mutation of a gene essential for ribosome biogenesis, EMG1, causes Bowen-Conradi syndrome*. Am J Hum Genet, 2009. **84**(6): p. 728-39.

95. Leulliot, N., et al., *The yeast ribosome synthesis factor Emg1 is a novel member of the superfamily of alpha/beta knot fold methyltransferases*. Nucleic Acids Res, 2008. **36**(2): p. 629-39.
96. Rohozinski, J., D.J. Lamb, and C.E. Bishop, *UTP14c is a recently acquired retrogene associated with spermatogenesis and fertility in man*. Biol Reprod, 2006. **74**(4): p. 644-51.
97. Bartelt-Kirbach, B., et al., *Expression analysis of genes lying in the NF1 microdeletion interval points to four candidate modifiers for neurofibroma formation*. Neurogenetics, 2009. **10**(1): p. 79-85.
98. Chagnon, P., et al., *A missense mutation (R565W) in cirhin (FLJ14728) in North American Indian childhood cirrhosis*. Am J Hum Genet, 2002. **71**(6): p. 1443-9.
99. Chi, Z.L., et al., *Mutant WDR36 directly affects axon growth of retinal ganglion cells leading to progressive retinal degeneration in mice*. Hum Mol Genet, 2010. **19**(19): p. 3806-15.
100. Skarie, J.M. and B.A. Link, *The primary open-angle glaucoma gene WDR36 functions in ribosomal RNA processing and interacts with the p53 stress-response pathway*. Hum Mol Genet, 2008. **17**(16): p. 2474-85.
101. Heiss, N.S., et al., *X-linked dyskeratosis congenita is caused by mutations in a highly conserved gene with putative nucleolar functions*. Nat Genet, 1998. **19**(1): p. 32-8.
102. Ruggero, D., et al., *Dyskeratosis congenita and cancer in mice deficient in ribosomal RNA modification*. Science, 2003. **299**(5604): p. 259-62.
103. Vulliamy, T., et al., *Mutations in the telomerase component NHP2 cause the premature ageing syndrome dyskeratosis congenita*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(23): p. 8073-8.
104. Yoon, A., et al., *Impaired control of IRES-mediated translation in X-linked dyskeratosis congenita*. Science, 2006. **312**(5775): p. 902-6.
105. Bonafe, L., et al., *Evolutionary comparison provides evidence for pathogenicity of RMRP mutations*. PLoS Genet, 2005. **1**(4): p. e47.
106. Ridanpaa, M., et al., *Mutations in the RNA component of RNase MRP cause a pleiotropic human disease, cartilage-hair hypoplasia*. Cell, 2001. **104**(2): p. 195-203.
107. Thiel, C.T., et al., *Severely incapacitating mutations in patients with extreme short stature identify RNA-processing endoribonuclease RMRP as an essential cell growth regulator*. Am J Hum Genet, 2005. **77**(5): p. 795-806.
108. Ding, F., et al., *SnoRNA Snord116 (Pwcr1/MBII-85) deletion causes growth deficiency and hyperphagia in mice*. PLoS One, 2008. **3**(3): p. e1709.
109. Sahoo, T., et al., *Prader-Willi phenotype caused by paternal deficiency for the HBII-85 C/D box small nucleolar RNA cluster*. Nat Genet, 2008. **40**(6): p. 719-21.
110. Skryabin, B.V., et al., *Deletion of the MBII-85 snoRNA gene cluster in mice results in postnatal growth retardation*. PLoS Genet, 2007. **3**(12): p. e235.
111. Wu, C.H., et al., *Combined analysis of murine and human microarrays and ChIP analysis reveals genes associated with the ability of MYC to maintain tumorigenesis*. PLoS Genet, 2008. **4**(6): p. e1000090.
112. Ruggero, D. and P.P. Pandolfi, *Does the ribosome translate cancer?* Nat Rev Cancer, 2003. **3**(3): p. 179-92.
113. Stumpf, C.R. and D. Ruggero, *The cancerous translation apparatus*. Curr Opin Genet Dev, 2011. **21**(4): p. 474-83.
114. Pianese, G., *Beitrag zur Histologie und Aetiologie des Carcinoms, histologische und experimentelle Untersuchungen, von Dr. Giuseppe Pianese,... aus dem italienischen übersetzt von... R. Teuscher*. 1896, Jena: G. Fischer. In-8°, VI-194, pl. en coul.
115. Derenzini, M., L. Montanaro, and D. Trere, *What the nucleolus says to a tumour pathologist*. Histopathology, 2009. **54**(6): p. 753-62.
116. Trere, D., et al., *Nucleolar size and activity are related to pRb and p53 status in human breast cancer*. J Histochem Cytochem, 2004. **52**(12): p. 1601-7.
117. Derenzini, M., et al., *The prognostic value of the AgNOR parameter in human breast cancer depends on the pRb and p53 status*. J Clin Pathol, 2004. **57**(7): p. 755-61.

118. Kao, C.F., S.Y. Chen, and Y.H. Lee, *Activation of RNA polymerase I transcription by hepatitis C virus core protein*. J Biomed Sci, 2004. **11**(1): p. 72-94.
119. Raychaudhuri, S., et al., *Activation of ribosomal RNA transcription by hepatitis C virus involves upstream binding factor phosphorylation via induction of cyclin D1*. Cancer Res, 2009. **69**(5): p. 2057-64.
120. Lee, R.G., A.C. Tsamandas, and A.J. Demetris, *Large cell change (liver cell dysplasia) and hepatocellular carcinoma in cirrhosis: matched case-control study, pathological analysis, and pathogenetic hypothesis*. Hepatology, 1997. **26**(6): p. 1415-22.
121. Lazaris-Karatzas, A., K.S. Montine, and N. Sonenberg, *Malignant transformation by a eukaryotic initiation factor subunit that binds to mRNA 5' cap*. Nature, 1990. **345**(6275): p. 544-7.
122. Ruggero, D., et al., *The translation factor eIF-4E promotes tumor formation and cooperates with c-Myc in lymphomagenesis*. Nat Med, 2004. **10**(5): p. 484-6.
123. Sieron, P., et al., *DKC1 overexpression associated with prostate cancer progression*. Br J Cancer, 2009. **101**(8): p. 1410-6.
124. Menne, T.F., et al., *The Shwachman-Bodian-Diamond syndrome protein mediates translational activation of ribosomes in yeast*. Nat Genet, 2007. **39**(4): p. 486-95.
125. Hellen, C.U. and P. Sarnow, *Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules*. Genes Dev, 2001. **15**(13): p. 1593-612.
126. Qin, X. and P. Sarnow, *Preferential translation of internal ribosome entry site-containing mRNAs during the mitotic cycle in mammalian cells*. J Biol Chem, 2004. **279**(14): p. 13721-8.
127. Gilbert, W.V., *Alternative ways to think about cellular internal ribosome entry*. J Biol Chem, 2010. **285**(38): p. 29033-8.
128. Mokrejs, M., et al., *IRESite--a tool for the examination of viral and cellular internal ribosome entry sites*. Nucleic Acids Res, 2010. **38**(Database issue): p. D131-6.
129. Mokrejs, M., et al., *IRESite: the database of experimentally verified IRES structures* (www.iresite.org). Nucleic Acids Res, 2006. **34**(Database issue): p. D125-30.
130. Belin, S., et al., *Dysregulation of ribosome biogenesis and translational capacity is associated with tumor progression of human breast cancer cells*. PLoS One, 2009. **4**(9): p. e7147.
131. Lessard, F., et al., *The ARF tumor suppressor controls ribosome biogenesis by regulating the RNA polymerase I transcription factor TTF-I*. Mol Cell, 2010. **38**(4): p. 539-50.
132. Itahana, K., et al., *Tumor suppressor ARF degrades B23, a nucleolar protein involved in ribosome biogenesis and cell proliferation*. Mol Cell, 2003. **12**(5): p. 1151-64.
133. Lee, S.B., et al., *Ribosomal protein S3, a new substrate of Akt, serves as a signal mediator between neuronal apoptosis and DNA repair*. J Biol Chem, 2010. **285**(38): p. 29457-68.
134. Hoppe, S., et al., *AMP-activated protein kinase adapts rRNA synthesis to cellular energy supply*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(42): p. 17781-6.
135. Cavanaugh, A.H., et al., *Activity of RNA polymerase I transcription factor UBF blocked by Rb gene product*. Nature, 1995. **374**(6518): p. 177-80.
136. Zhai, W. and L. Comai, *Repression of RNA polymerase I transcription by the tumor suppressor p53*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(16): p. 5930-8.
137. Arabi, A., et al., *c-Myc associates with ribosomal DNA and activates RNA polymerase I transcription*. Nat Cell Biol, 2005. **7**(3): p. 303-10.
138. Grandori, C., et al., *c-Myc binds to human ribosomal DNA and stimulates transcription of rRNA genes by RNA polymerase I*. Nat Cell Biol, 2005. **7**(3): p. 311-8.
139. Grewal, S.S., et al., *Myc-dependent regulation of ribosomal RNA synthesis during Drosophila development*. Nat Cell Biol, 2005. **7**(3): p. 295-302.
140. van Riggelen, J., A. Yetil, and D.W. Felsher, *MYC as a regulator of ribosome biogenesis and protein synthesis*. Nat Rev Cancer, 2010. **10**(4): p. 301-9.
141. Schlosser, I., et al., *Dissection of transcriptional programmes in response to serum and c-Myc in a human B-cell line*. Oncogene, 2005. **24**(3): p. 520-4.

142. Schlosser, I., et al., *A role for c-Myc in the regulation of ribosomal RNA processing*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(21): p. 6148-56.
143. Barna, M., et al., *Suppression of Myc oncogenic activity by ribosomal protein haploinsufficiency*. Nature, 2008. **456**(7224): p. 971-5.
144. Drygin, D., W.G. Rice, and I. Grummt, *The RNA polymerase I transcription machinery: an emerging target for the treatment of cancer*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2010. **50**: p. 131-56.
145. McStay, B. and I. Grummt, *The epigenetics of rRNA genes: from molecular to chromosome biology*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2008. **24**: p. 131-57.
146. Beumer, J.H. and H. Tawbi, *Role of histone deacetylases and their inhibitors in cancer biology and treatment*. Curr Clin Pharmacol, 2010. **5**(3): p. 196-208.
147. Drygin, D., et al., *Anticancer activity of CX-3543: a direct inhibitor of rRNA biogenesis*. Cancer Res, 2009. **69**(19): p. 7653-61.
148. Drygin, D., et al., *Targeting RNA polymerase I with an oral small molecule CX-5461 inhibits ribosomal RNA synthesis and solid tumor growth*. Cancer Res, 2011. **71**(4): p. 1418-30.
149. Russell, J. and J.C. Zomerdiijk, *RNA-polymerase-I-directed rDNA transcription, life and works*. Trends Biochem Sci, 2005. **30**(2): p. 87-96.
150. Henderson, A.S., D. Warburton, and K.C. Atwood, *Location of ribosomal DNA in the human chromosome complement*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1972. **69**(11): p. 3394-8.
151. Moss, T., *A transcriptional function for the repetitive ribosomal spacer in Xenopus laevis*. Nature, 1983. **302**(5905): p. 223-8.
152. Miller, D.A., Y.C. Choi, and O.J. Miller, *Chromosome localization of highly repetitive human DNA's and amplified ribosomal DNA with restriction enzymes*. Science, 1983. **219**(4583): p. 395-7.
153. Miller, J.R., D.C. Hayward, and D.M. Glover, *Transcription of the 'non-transcribed' spacer of Drosophila melanogaster rDNA*. Nucleic Acids Res, 1983. **11**(1): p. 11-9.
154. Cassidy, B.G., H.F. Yang-Yen, and L.I. Rothblum, *Additional RNA polymerase I initiation site within the nontranscribed spacer region of the rat rRNA gene*. Mol Cell Biol, 1987. **7**(7): p. 2388-96.
155. Tower, J., et al., *An RNA polymerase I promoter located in the CHO and mouse ribosomal DNA spacers: functional analysis and factor and sequence requirements*. Mol Cell Biol, 1989. **9**(4): p. 1513-25.
156. Boseley, P., et al., *Sequence organization of the spacer DNA in a ribosomal gene unit of Xenopus laevis*. Cell, 1979. **17**(1): p. 19-31.
157. De Winter, R.F. and T. Moss, *Spacer promoters are essential for efficient enhancement of X. laevis ribosomal transcription*. Cell, 1986. **44**(2): p. 313-8.
158. Mayer, C., et al., *Intergenic transcripts regulate the epigenetic state of rRNA genes*. Mol Cell, 2006. **22**(3): p. 351-61.
159. Bell, S.P., H.M. Jantzen, and R. Tjian, *Assembly of alternative multiprotein complexes directs rRNA promoter selectivity*. Genes Dev, 1990. **4**(6): p. 943-54.
160. Learned, R.M., et al., *Regulation of human ribosomal RNA transcription*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1983. **80**(12): p. 3558-62.
161. Haltiner, M.M., S.T. Smale, and R. Tjian, *Two distinct promoter elements in the human rRNA gene identified by linker scanning mutagenesis*. Mol Cell Biol, 1986. **6**(1): p. 227-35.
162. Learned, R.M., et al., *Human rRNA transcription is modulated by the coordinate binding of two factors to an upstream control element*. Cell, 1986. **45**(6): p. 847-57.
163. Grummt, I., *Life on a planet of its own: regulation of RNA polymerase I transcription in the nucleolus*. Genes Dev, 2003. **17**(14): p. 1691-702.
164. White, R.J., *RNA polymerase III transcription and cancer*. Oncogene, 2004. **23**(18): p. 3208-16.
165. Kuhn, C.D., et al., *Functional architecture of RNA polymerase I*. Cell, 2007. **131**(7): p. 1260-72.
166. Werner, M., P. Thuriaux, and J. Soutourina, *Structure-function analysis of RNA polymerases I and III*. Curr Opin Struct Biol, 2009. **19**(6): p. 740-5.

167. Geiger, S.R., et al., *RNA polymerase I contains a TFIIF-related DNA-binding subcomplex*. Mol Cell, 2010. **39**(4): p. 583-94.
168. Beckouet, F., et al., *Two RNA polymerase I subunits control the binding and release of Rrn3 during transcription*. Mol Cell Biol, 2008. **28**(5): p. 1596-605.
169. Prescott, E.M., et al., *Transcriptional termination by RNA polymerase I requires the small subunit Rpa12p*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(16): p. 6068-73.
170. Prieto, J.L. and B. McStay, *Recruitment of factors linking transcription and processing of pre-rRNA to NOR chromatin is UBF-dependent and occurs independent of transcription in human cells*. Genes Dev, 2007. **21**(16): p. 2041-54.
171. Santoro, R., J. Li, and I. Grummt, *The nucleolar remodeling complex NoRC mediates heterochromatin formation and silencing of ribosomal gene transcription*. Nat Genet, 2002. **32**(3): p. 393-6.
172. Haaf, T., D.L. Hayman, and M. Schmid, *Quantitative determination of rDNA transcription units in vertebrate cells*. Exp Cell Res, 1991. **193**(1): p. 78-86.
173. Sanij, E., et al., *UBF levels determine the number of active ribosomal RNA genes in mammals*. J Cell Biol, 2008. **183**(7): p. 1259-74.
174. Stefanovsky, V., et al., *Growth factor signaling regulates elongation of RNA polymerase I transcription in mammals via UBF phosphorylation and r-chromatin remodeling*. Mol Cell, 2006. **21**(5): p. 629-39.
175. Murayama, A., et al., *Epigenetic control of rDNA loci in response to intracellular energy status*. Cell, 2008. **133**(4): p. 627-39.
176. Bell, S.P., et al., *Functional cooperativity between transcription factors UBF1 and SL1 mediates human ribosomal RNA synthesis*. Science, 1988. **241**(4870): p. 1192-7.
177. Jordan, P., et al., *In vivo evidence that TATA-binding protein/SL1 colocalizes with UBF and RNA polymerase I when rRNA synthesis is either active or inactive*. J Cell Biol, 1996. **133**(2): p. 225-34.
178. Hanada, K., et al., *RNA polymerase I associated factor 53 binds to the nucleolar transcription factor UBF and functions in specific rDNA transcription*. EMBO J, 1996. **15**(9): p. 2217-26.
179. Miller, G., et al., *hRRN3 is essential in the SL1-mediated recruitment of RNA Polymerase I to rRNA gene promoters*. EMBO J, 2001. **20**(6): p. 1373-82.
180. Bazett-Jones, D.P., et al., *Short-range DNA looping by the Xenopus HMG-box transcription factor, xUBF*. Science, 1994. **264**(5162): p. 1134-7.
181. Dvir, A., *Promoter escape by RNA polymerase II*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1577**(2): p. 208-223.
182. Panov, K.I., et al., *UBF activates RNA polymerase I transcription by stimulating promoter escape*. EMBO J, 2006. **25**(14): p. 3310-22.
183. Panov, K.I., J.K. Friedrich, and J.C. Zomerdiik, *A step subsequent to preinitiation complex assembly at the ribosomal RNA gene promoter is rate limiting for human RNA polymerase I-dependent transcription*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(8): p. 2641-9.
184. Hirschler-Laszkiewicz, I., et al., *Rrn3 becomes inactivated in the process of ribosomal DNA transcription*. J Biol Chem, 2003. **278**(21): p. 18953-9.
185. El Hage, A., et al., *Loss of Topoisomerase I leads to R-loop-mediated transcriptional blocks during ribosomal RNA synthesis*. Genes Dev, 2010. **24**(14): p. 1546-58.
186. Conconi, A., V.A. Bessalov, and M.J. Smerdon, *Transcription-coupled repair in RNA polymerase I-transcribed genes of yeast*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(2): p. 649-54.
187. Jansa, P. and I. Grummt, *Mechanism of transcription termination: PTRF interacts with the largest subunit of RNA polymerase I and dissociates paused transcription complexes from yeast and mouse*. Mol Gen Genet, 1999. **262**(3): p. 508-14.
188. Mayer, C., H. Bierhoff, and I. Grummt, *The nucleolus as a stress sensor: JNK2 inactivates the transcription factor TIF-1A and down-regulates rRNA synthesis*. Genes Dev, 2005. **19**(8): p. 933-41.
189. Friedrich, J.K., et al., *TBP-TAF complex SL1 directs RNA polymerase I pre-initiation complex formation and stabilizes upstream binding factor at the rDNA promoter*. J Biol Chem, 2005. **280**(33): p. 29551-8.

190. O'Sullivan, A.C., G.J. Sullivan, and B. McStay, *UBF binding in vivo is not restricted to regulatory sequences within the vertebrate ribosomal DNA repeat*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(2): p. 657-68.
191. Pelletier, G., et al., *Competitive recruitment of CBP and Rb-HDAC regulates UBF acetylation and ribosomal transcription*. Mol Cell, 2000. **6**(5): p. 1059-66.
192. Meraner, J., et al., *Acetylation of UBF changes during the cell cycle and regulates the interaction of UBF with RNA polymerase I*. Nucleic Acids Res, 2006. **34**(6): p. 1798-806.
193. Muth, V., et al., *Acetylation of TAF(I)68, a subunit of TIF-IB/SL1, activates RNA polymerase I transcription*. EMBO J, 2001. **20**(6): p. 1353-62.
194. Ford, E., et al., *Mammalian Sir2 homolog SIRT7 is an activator of RNA polymerase I transcription*. Genes Dev, 2006. **20**(9): p. 1075-80.
195. Blander, G. and L. Guarente, *The Sir2 family of protein deacetylases*. Annu Rev Biochem, 2004. **73**: p. 417-35.
196. Klein, J. and I. Grummt, *Cell cycle-dependent regulation of RNA polymerase I transcription: the nucleolar transcription factor UBF is inactive in mitosis and early G1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(11): p. 6096-101.
197. Voit, R., M. Hoffmann, and I. Grummt, *Phosphorylation by G1-specific cdk-cyclin complexes activates the nucleolar transcription factor UBF*. EMBO J, 1999. **18**(7): p. 1891-9.
198. Clemente-Blanco, A., et al., *Cdc14 inhibits transcription by RNA polymerase I during anaphase*. Nature, 2009. **458**(7235): p. 219-22.
199. Voit, R., et al., *The nucleolar transcription factor mUBF is phosphorylated by casein kinase II in the C-terminal hyperacidic tail which is essential for transactivation*. EMBO J, 1992. **11**(6): p. 2211-8.
200. Foe, V.E., L.E. Wilkinson, and C.D. Laird, *Comparative organization of active transcription units in Oncopeltus fasciatus*. Cell, 1976. **9**(1): p. 131-46.
201. Beyer, A.L. and Y.N. Osheim, *Splice site selection, rate of splicing, and alternative splicing on nascent transcripts*. Genes Dev, 1988. **2**(6): p. 754-65.
202. Osheim, Y.N., N.J. Proudfoot, and A.L. Beyer, *EM visualization of transcription by RNA polymerase II: downstream termination requires a poly(A) signal but not transcript cleavage*. Mol Cell, 1999. **3**(3): p. 379-87.
203. Venters, B.J. and B.F. Pugh, *A canonical promoter organization of the transcription machinery and its regulators in the Saccharomyces genome*. Genome Res, 2009. **19**(3): p. 360-71.
204. Busch, H. and L. Rothblum, *The Cell nucleus*. 1974, New York: Academic Press. v. <1-12 >.
205. French, S.L., et al., *In exponentially growing Saccharomyces cerevisiae cells, rRNA synthesis is determined by the summed RNA polymerase I loading rate rather than by the number of active genes*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(5): p. 1558-68.
206. Stefanovsky, V. and T. Moss, *Regulation of rRNA synthesis in human and mouse cells is not determined by changes in active gene count*. Cell Cycle, 2006. **5**(7): p. 735-9.
207. Stefanovsky, V.Y., et al., *An immediate response of ribosomal transcription to growth factor stimulation in mammals is mediated by ERK phosphorylation of UBF*. Mol Cell, 2001. **8**(5): p. 1063-73.
208. Anderson, S.J., et al., *The transcription elongation factor Spt5 influences transcription by RNA polymerase I positively and negatively*. J Biol Chem, 2011. **286**(21): p. 18816-24.
209. Zhang, Y., et al., *The Paf1 complex is required for efficient transcription elongation by RNA polymerase I*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(7): p. 2153-8.
210. Guenther, M.G., et al., *A chromatin landmark and transcription initiation at most promoters in human cells*. Cell, 2007. **130**(1): p. 77-88.
211. Muse, G.W., et al., *RNA polymerase is poised for activation across the genome*. Nat Genet, 2007. **39**(12): p. 1507-11.

212. Zeitlinger, J., et al., *RNA polymerase stalling at developmental control genes in the Drosophila melanogaster embryo*. Nat Genet, 2007. **39**(12): p. 1512-6.
213. Core, L.J., J.J. Waterfall, and J.T. Lis, *Nascent RNA sequencing reveals widespread pausing and divergent initiation at human promoters*. Science, 2008. **322**(5909): p. 1845-8.
214. Poortinga, G., et al., *c-MYC coordinately regulates ribosomal gene chromatin remodeling and Pol I availability during granulocyte differentiation*. Nucleic Acids Res, 2011. **39**(8): p. 3267-81.
215. Osheim, Y.N., et al., *Pre-18S ribosomal RNA is structurally compacted into the SSU processome prior to being cleaved from nascent transcripts in Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell, 2004. **16**(6): p. 943-54.
216. Sanij, E. and R.D. Hannan, *The role of UBF in regulating the structure and dynamics of transcriptionally active rDNA chromatin*. Epigenetics, 2009. **4**(6): p. 374-82.
217. Strobl, L.J. and D. Eick, *Hold back of RNA polymerase II at the transcription start site mediates down-regulation of c-myc in vivo*. EMBO J, 1992. **11**(9): p. 3307-14.
218. Albert, B., et al., *RNA polymerase I-specific subunits promote polymerase clustering to enhance the rRNA gene transcription cycle*. J Cell Biol, 2011. **192**(2): p. 277-93.
219. Dragon, F., et al., *A large nucleolar U3 ribonucleoprotein required for 18S ribosomal RNA biogenesis*. Nature, 2002. **417**(6892): p. 967-70.
220. Phipps, K.R., J.M. Charette, and S.J. Baserga, *The SSU Processome in Ribosome Biogenesis - Progress and Prospects*. WIREs RNA, 2011. **2**(1): p. 1-21.
221. Krogan, N.J., et al., *High-definition macromolecular composition of yeast RNA-processing complexes*. Mol Cell, 2004. **13**(2): p. 225-39.
222. Gallagher, J.E., et al., *RNA polymerase I transcription and pre-rRNA processing are linked by specific SSU processome components*. Genes Dev, 2004. **18**(20): p. 2506-17.
223. Miller, O.L., Jr. and A.H. Bakken, *Morphological studies of transcription*. Acta Endocrinol Suppl (Copenh), 1972. **168**: p. 155-77.
224. Mardis, E.R., *Next-generation DNA sequencing methods*. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2008. **9**: p. 387-402.
225. Frey, U.H., et al., *PCR-amplification of GC-rich regions: 'slowdown PCR'*. Nat Protoc, 2008. **3**(8): p. 1312-7.
226. Benjamini, Y. and T.P. Speed, *Summarizing and correcting the GC content bias in high-throughput sequencing*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(10): p. e72.
227. Romiguier, J., et al., *Contrasting GC-content dynamics across 33 mammalian genomes: relationship with life-history traits and chromosome sizes*. Genome Res, 2010. **20**(8): p. 1001-9.
228. Bleichert, F., et al., *The PINc domain protein Utp24, a putative nuclease, is required for the early cleavage steps in 18S rRNA maturation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(25): p. 9464-9.
229. Jackson, D.A., A. Pombo, and F. Iborra, *The balance sheet for transcription: an analysis of nuclear RNA metabolism in mammalian cells*. FASEB J, 2000. **14**(2): p. 242-54.
230. Mais, C., et al., *UBF-binding site arrays form pseudo-NORs and sequester the RNA polymerase I transcription machinery*. Genes Dev, 2005. **19**(1): p. 50-64.
231. Pistoni, M., et al., *Chromatin association and regulation of rDNA transcription by the Ras-family protein RasL11a*. EMBO J, 2010. **29**(7): p. 1215-24.
232. Henras, A.K., et al., *The post-transcriptional steps of eukaryotic ribosome biogenesis*. Cell Mol Life Sci, 2008. **65**(15): p. 2334-59.
233. Greenberg, H. and S. Penman, *Methylation and processing of ribosomal RNA in HeLa cells*. J Mol Biol, 1966. **21**(3): p. 527-35.
234. Vaughan, M.H., Jr., et al., *The effects of methionine deprivation on ribosome synthesis in HeLa cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1967. **58**(4): p. 1527-34.
235. Maden, B.E., *The numerous modified nucleotides in eukaryotic ribosomal RNA*. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 1990. **39**: p. 241-303.

-
236. Maden, B.E., *Identification of the locations of the methyl groups in 18 S ribosomal RNA from Xenopus laevis and man*. J Mol Biol, 1986. **189**(4): p. 681-99.
 237. McCallum, F.S. and B.E. Maden, *Human 18 S ribosomal RNA sequence inferred from DNA sequence. Variations in 18 S sequences and secondary modification patterns between vertebrates*. Biochem J, 1985. **232**(3): p. 725-33.
 238. Veinot-Drebot, L.M., R.A. Singer, and G.C. Johnston, *Rapid initial cleavage of nascent pre-rRNA transcripts in yeast*. J Mol Biol, 1988. **199**(1): p. 107-13.
 239. Bohnsack, M.T., et al., *Prp43 bound at different sites on the pre-rRNA performs distinct functions in ribosome synthesis*. Mol Cell, 2009. **36**(4): p. 583-92.
 240. van Nues, R.W., et al., *Box C/D snoRNP catalysed methylation is aided by additional pre-rRNA base-pairing*. EMBO J, 2011. **30**(12): p. 2420-30.
 241. Maden, B.E. and M. Salim, *The methylated nucleotide sequences in HELA cell ribosomal RNA and its precursors*. J Mol Biol, 1974. **88**(1): p. 133-52.
 242. Maden, B.E., *Locations of methyl groups in 28 S rRNA of Xenopus laevis and man. Clustering in the conserved core of molecule*. J Mol Biol, 1988. **201**(2): p. 289-314.

7 Danksagung

Ich möchte Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dirk Eick für seine jahrelange Unterstützung innerhalb und außerhalb der Wissenschaft danken. Er ermöglichte mir für einen bedeutenden Zeitraum meines Studiums, Teil eines wunderbaren Labors zu sein.

Herrn Prof. Dr. med. Gustav Klobeck danke ich für die Vertretung meiner Promotion vor der medizinischen Fakultät.

Prof. Dr. med. Michael Hölzel war der herausragende Betreuer in den ersten Jahren meiner wissenschaftlichen Tätigkeit. Von ihm habe ich die essentiellen Grundlagen jedes experimentellen Arbeitens erlernt.

Prof. John Lis und Leighton Core, PhD, stellten uns ihre einzigartigen Daten der GRO-Seq Methode großzügig zur Verfügung.

Für die schöne Zeit im Labor danke ich Dr. rer. nat. Martin Heidemann, Dr. rer. nat. Michaela Rohmoser, Dr. rer. nat. Thomas Harasim, Dr. rer. nat. Rob Chapman, Dipl.-biol. Kaspar Burger, Dipl.-biol. Roland Schüller, Dipl.-biol. Bastian Mühl, Dipl.-biol. Markus Kellner, Dipl.-biol. Corinna Hintermair, Anita Gruber-Eber

Dem Programm zur Förderung von Forschung und Lehre (FöFoLe) unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Jürgen Heesemann danke ich für die finanzielle und ideelle Unterstützung meiner Promotion.

Meiner lieben Partnerin Judith Kaste, meinem Bruder und meinen Eltern danke ich für ihre bedingungslose und liebevolle Unterstützung in allen Lebenslagen der vergangenen Jahre.

8 Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

„Die Verteilung transkribierender RNA-Polymerase I auf ribosomaler DNA“

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.